

Versuche zur Isolierung und Reindarstellung
von *Bacillus subtilis* -
Hemmstoffen aus der Eschenrinde

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München 1963

vorgelegt von
Hussein Naimie
aus
Kabul/ Afghanistan

Mai 1963



Berichterstatter: 1. Prof. Dr. Dr. h. c. B. Huber; 2. Prof. Dr. L. Brauner
Tag der mündlichen Prüfung: 24. VII. 1963

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
1. Begriffsbestimmung und Literatur	1
2. Bisherige Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der Eschenrinde	2
B. Orientierende Vorversuche mit verschiedenen Rindenextrakten	4
1. Material und Methodik der eigenen Untersuchungen	4
a) Testextrakt-Gewinnung	4
b) Mikrobiologischer Nachweis	4
2. Vorkommen, Hemmintensität und Grenzkonzentration der antibiotischen Stoffe bei 12 Baumarten	6
a) Vorkommen der antibiotischen Stoffe	6
b) Hemmintensität und Grenzkonzentrationsbestimmung	6
3. Einfluß von Temperatur und Alterung auf die Aktivität des Rohextraktes	7
a) Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Temperatur	7
b) Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Alterung ..	9
C. Hauptversuche: Die Isolierung der Bacillus subtilis-Hemmstoffe aus der Eschenrinde	10
1. Material und Methodik der Rohextraktgewinnung	10
2. Chemische Aufarbeitung des Rohextraktes	11
a) Ausschüttel-Verfahren	11
b) Soxhlet-Verfahren	13
3. Verteilungschromatographische Aufarbeitung der aktiven Stoffe	15
4. Reinigung der aktiven Fraktionen	17
a) Papierchromatographische Isolierung und Reindarstellung von Hemmstoff I	17
b) Reinigung von Hemmstoff III	17
c) Reinigung von Hemmstoff II	18
d) Reinigung von Hemmstoff IV	20
aa) Reinigung über saurem Aluminium-Oxyd	20
bb) Reinigung über Kalziumphosphat	22
5. Papierchromatographischer Reinheitstest der Hemmstoffe I und III	24
6. Sekundäre Hemmhöfe bei Hemmstoff IV	24
7. Eine neue Isolierungsmethode für den Hemmstoff IV	24
8. Chemische und physikalische Eigenschaften der Hemmstoffe I, III und IV	26
a) Hemmstoff I	26
b) Hemmstoff III	27
c) Identifizierung des Hemmstoffs IV	28
9. Dünnschichtchromatographische Prüfung des Extraktes auf Tyrosol	34
10. Identifizierung eines nicht aktiven, kristallinen Stoffes aus der Eschenrinde	36
D. Zusammenfassung	40
Nachwort	41
Literaturverzeichnis	41



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Forstbotanischen Institut der Bayerischen Forstlichen Forschungs-
anstalt. Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. B. H u b e r

Versuche zur Isolierung und Reindarstellung von *Bacillus subtilis*-Hemmstoffen aus der Eschenrinde

Von

Hussein Naimie

A. Einleitung

Im Anschluß an die chemische Isolierung von präformierten bakterio-
statischen und fungistatischen Stoffen aus weiblichen B l ü t e n o r g a -
n e n (22, 25, 26) wurden im Forstbotanischen Institut in München
Untersuchungen über die Verbreitung solcher Stoffe in anderen, beson-
ders vegetativen Geweben der höheren Pflanzen durchgeführt (23, 24).
Während die meisten Gewebe ohne Erfolg geprüft wurden, erwiesen
sich die K a m b i e n und die lebenden Teile der R i n d e von zwölf
verschiedenen Laub- und Nadelhölzern als bakterio- und fungistatisch.
Mir wurde im Rahmen einer Dissertation die Aufgabe zuteil zu prüfen,
welche von den zwölf Baumarten die stärkste biologische Wirksamkeit
besitzt. Außerdem sollten die aktiven Faktoren aus der biologisch wirk-
samsten Rindenart, aus der Rinde von *Fraxinus exelsior*, in reiner Form
isoliert werden.

1. Begriffsbestimmung und Literatur

Die im Stoffwechsel von Organismen gebildeten organischen Stoffe,
die eine antagonistische Wirkung auf andere Organismen ausüben und
dem bildenden Organismus als Schutz dienen, werden allgemein als
Antibiotika bezeichnet (17, 44, 50). Dieser Begriff wurde ursprünglich
für antibakterielle Substanzen, die von Mikroorganismen, später auch
für Stoffe mit antagonistischer Wirkung, die in höheren Organismen
gebildet wurden, verwendet. Es sind zwei antibiotische Wirkmechanis-
men zu unterscheiden: der b a k t e r i z i d e (fungizide, protozoide)
und der b a k t e r i o s t a t i s c h e (fungistatische). Der erste Aus-
druck bezeichnet eine Organismen tötende, der zweite eine das Wachstum
von Organismen hemmende Wirkung.

Im Jahre 1877 konnte P A S T E U R (32) beobachten, daß gewisse Mikro-
organismen das normale Wachstum von *Bacillus anthracis* verhindern.
Ähnliche Beobachtungen wurden 1879 von D E B A R Y (10) gemacht, der
dieses Phänomen bereits als A n t i b i o s e bezeichnet. Aber erst die
erneuten Beobachtungen Alexander FLEMINGS (16) im Jahre 1929 haben
die moderne Antibioseforschung eingeleitet. FLOREY und CHAIN (9)
konnten erstmals die aktiven antibiotischen Faktoren aus *Penicillium*
notatum isolieren. WAKSMAN (52) isolierte das Antibiotikum Strepto-

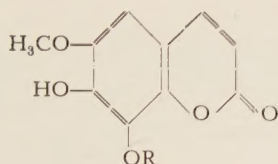
mycin aus *Streptomyces griseus*. Seitdem wurde eine Reihe von Antibiotika aus Bakterien und Pilzen in reinem Zustand isoliert.

OSBORN (35) hat die Untersuchungen über antibiotische Stoffe auf höhere Pflanzen ausgedehnt. Ihm folgten ATKINSON (1, 2), WINTER und WILLEKE (54, 56, 57), FERENCY und GRACZA (14), KIENHOLZ und KEMKES (28), TOKIN (44), VIRTANEN (45, 46, 47, 48, 49), KLÖPPING und VAN DER KERK (29) sowie JUNG (22, 23, 24, 25, 26).

Während die meisten der genannten Autoren die Heilwirkung der antibiotischen Stoffe aus höheren Pflanzen auf menschliche und tierische Organismen prüften, haben sich VIRTANEN, JUNG und außerdem BUTIN und LOESCHKE (8) mit den sich ergebenden Fragen der pflanzlichen Immunität beschäftigt. VIRTANEN (49) konnte aus nördlichen Roggensorten mit hoher Resistenz gegen *Fusarium nivale* einen antimikrobiellen Stoff (Benzoxazolinon) isolieren und damit POHJANHEIMO widerlegen, der die Resistenz dem Auxin zugeschrieben hatte. JUNG konnte verschiedene antibiotische Stoffe in weiblichen Blütenorganen von 61 verschiedenen Pflanzenarten sowie in Kambien und lebenden Rindenteilen von zwölf Laub- und Nadelholzarten nachweisen. Dabei zeigte sich, daß die Hemmwirkung dieser Stoffe gegen Pilze und Bakterien innerhalb verschiedener Rassen einer Art verschieden groß ist und die biologische Aktivität der Hemmstoffe in der Hauptvegetationszeit ein Mehrfaches der Aktivität während der Vegetationsruhe beträgt. KLÖPPING und VAN DER KERK (29) haben aus den wäßrigen Extrakten der Frischrinde von *Populus candicans* zwei pilzhemmende Substanzen isoliert, von denen eine als Benzylester der Gentisinsäure identifiziert wurde. Auch BUTIN und LOESCHKE (8) berichten über zwei fungistatische Stoffe aus der Pappelrinde, von denen einer als Brenzkatechin identifiziert werden konnte. Bei der zweiten Substanz konnten sie feststellen, daß nach der Hydrolyse die keimungshemmende Wirkung gesteigert wird. Sie vermuten, daß ein entsprechender Vorgang bei der Abwehrreaktion resistenter Pappeln fermentativ erfolgen kann. Weiterhin brachten sie die verschieden starke Anfälligkeit mehrerer Pappelsorten gegen Pilze in ursächlichen Zusammenhang mit dem Vorhandensein der genannten Stoffe. WAGNER (51) hat in einem zusammenfassenden Referat über die antibiotische Wirkung höherer Pflanzen, insbesondere der Arzneipflanzen, berichtet.

2. Bisher durchgeführte Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der Eschenrinde

Als erster charakteristischer Inhaltsstoff der Eschenrinde (*Fraxinus excelsior* L., *Oleaceae*) wurde von SALM-HORSTMAR (36) das Cumarin-Glukosid Fraxin der Summenformel $C_{10}H_{18}O_{10}$ und dem Schmelzpunkt 205° beschrieben. Bei der Hydrolyse wurde die Verbindung in Glukose und in das Aglukon Fraxetin gespalten. Fraxetin ($C_{10}H_8O_5$, $F_p = 227-228^{\circ}C$) wurde von BIGINELLI (5, 6) als ein Methoxy-dioxy-Cumarin erkannt. WESSELY und DEMMER (53) konnten die Stellung der Methoxy-Gruppe an C_6 und der OH-Gruppen an C_7 und C_8 im Fraxetin (I) sowie die Zuckerstellung im Fraxin (II) an C_8 ermitteln.

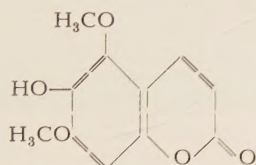


I, II

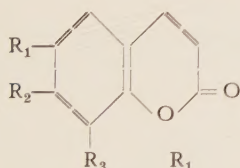
I: Fraxetin R = H

II: Fraxin R = Glukose

SPÄTH und JERZMONOWSKA-SIENKIEWICZOWA (39) isolierten bei der Verarbeitung frisch gesammelter Rinde weitere Cumarine aus der Eschenrinde. Durch erschöpfende Äther-Extraktion gelang es ihnen, ein in Äther schwerlösliches, nicht einheitliches Produkt von glykosidischem Charakter zu fassen. Bei der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure nach anschließender Hochvakuumdestillation erhielten sie das Aglykon Fraxinol (III) ($C_{11}H_{10}O_5$, Fp = 172—175° C). In der Mutterlauge des Fraxinols konnten sie zwei weitere Cumarine Fraxidin (IV) ($C_{11}H_{10}O_5$, Fp = 196—197° C) und Isofraxidin (V) ($C_{11}H_{10}O_5$, Fp = 148—149° C) isolieren (40).

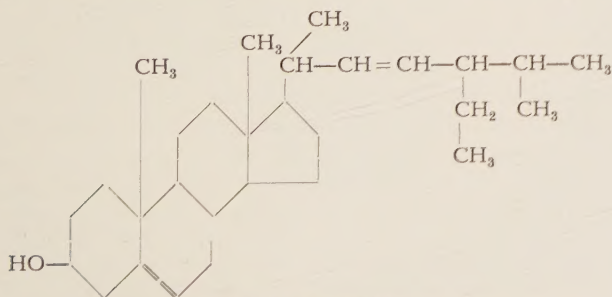


III: Fraxinol



	R ₁	R ₂	R ₃
IV: Fraxidin	OCH ₃	OCH ₃	OH
V: Isofraxidin	OCH ₃	OH	OCH ₃

Außer den erwähnten Cumarinen wurde als weiterer Inhaltsstoff der Eschenrinde Stigmasterin (VI) ($C_{29}H_{48}O$, Fp = 168—170° C) isoliert (38).



VI: Stigmasterin

Einige ältere Autoren wie KELLER (27) und BUCHNER (7) haben in der Eschenrinde einen Bitterstoff aufgefunden, den sie Fraxinin nannten. Unter genauer Einhaltung der KELLERSchen Isolierungsmethode konnten ROCHLEDER (34) und unabhängig davon STENHOUSE (42) kein Fraxinin, sondern Mannit aus der Eschenrinde isolieren.

B. Orientierende Vorversuche mit verschiedenen Rindenextrakten

Für orientierende Vorversuche wurden zunächst Ätherextrakte (1 a) aus den Rinden von 12 verschiedenen Baumarten hergestellt und durch Agardiffusionstest (1 b) auf Hemmintensität, Vorkommen und biologische Wirksamkeit geprüft. Das Material stammte aus dem Forstbotanischen Garten in Grafrath und wurde während der Vegetationsperiode gesammelt.

1. Material und Methodik der eigenen Untersuchungen

a) Testextrakt-Gewinnung

Als Untersuchungsmaterial wurden Zweige von einer durchschnittlichen Länge von 40—50 cm, einem Durchmesser von 5—10 cm und einem durchschnittlichen Alter von 7—15 Jahren verwendet. Nach der Entfernung der Epidermis und der chlorophyllhaltigen Schicht wurden der darunterliegende lebende Teil der Rinde und das Kambium vorsichtig geschält und fein zerkleinert. Da spätere Versuche zeigten, daß der Rohextrakt (s. S. 9) bei höheren Temperaturen und bei Alterung an biologischer Wirksamkeit verliert, wurde dieses Material 24 Std. lang bei -1 bis -2°C mit Äther ausgezogen. Die Extraktlösung wurde im rotierenden Vakuum-Verdampfer bei 30 — 40°C zur Trockne eingengt. Nach Aufnahme in Äther traten Niederschläge auf, die keine biologische Wirksamkeit besaßen. Nach Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugieren wurde die Lösung eingengt. Der so gewonnene, grün gefärbte, ölige Extrakt hat einen p_{H} -Wert zwischen 4,8—5,8; er wurde als Testextrakt verwendet.

b) Mikrobiologischer Nachweis

Als Testorganismus für die chemische Anreicherung wurde der in GAUMANN'S Laboratorium in Zürich für ähnliche Zwecke bewährte *Bacillus subtilis* verwendet. Die notwendige Ermittlung des „Wirkungsspektrums“ der auf diesem Wege isolierten Hemmstoffe gegenüber anderen Organismen ist Gegenstand einer besonderen Untersuchung Dr. JUNG'S.

Für die Testversuche wurde eine Sporensuspension wie folgt hergestellt: *B. subtilis* wurde in Kolle-Schalen auf OXO-LAB-LEMCO-Agar (5 g Pepton, 2,5 g NaCl, 17,5 g Agar, 1000 ml H_2O , p_{H} 7,2) bei 30°C 6 Tage im Brutschrank inkubiert, mit destilliertem Wasser von der Schale abgelöst, dreimal gewaschen und nach Abtötung eventueller Bakterien-Verunreinigung im Wasserbade bei 65°C mit 4 ml sterilem dest. Wasser aufgenommen.

In der sterilisierten Petrischale wurden 17,5 ml einer 2%igen Malzagar-Nährschicht, darauf als zweite Schicht 5 ml 2%iger Wasseragar mit der Sporensuspension gleichmäßig verteilt und als Nachweisreaktion der aktiven Stoffe die Methode des Agardiffusionstests (nach HEATLEY, 19) angewendet. Es wurden Filterpapierschleibchen von 5 mm (L + C-AG, Zürich) und 12 mm Durchmesser (Schleicher & Schüll) mit der zu untersuchenden Extraktlösung getränkt und steril auf Testplatten gelegt.

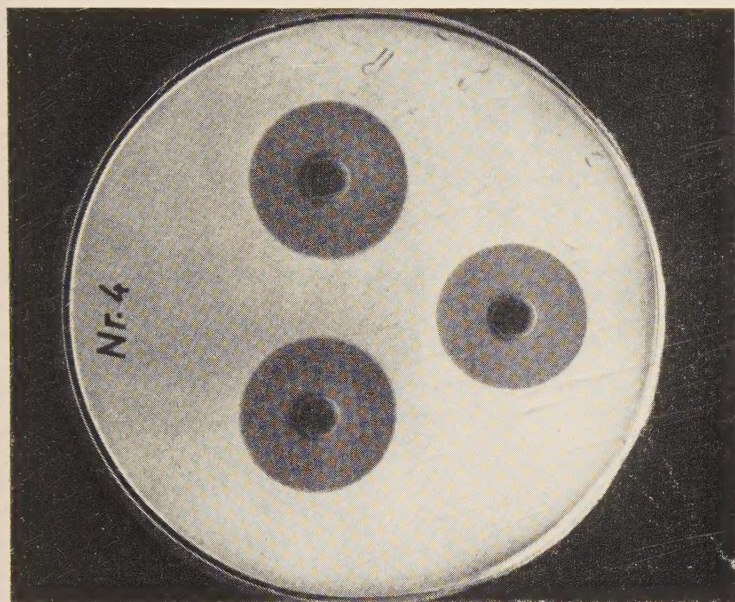


Abb. 1. Hemmwirkung des Rindenextraktes
von *Pseudotsuga menziesii*
auf *Bacillus subtilis*

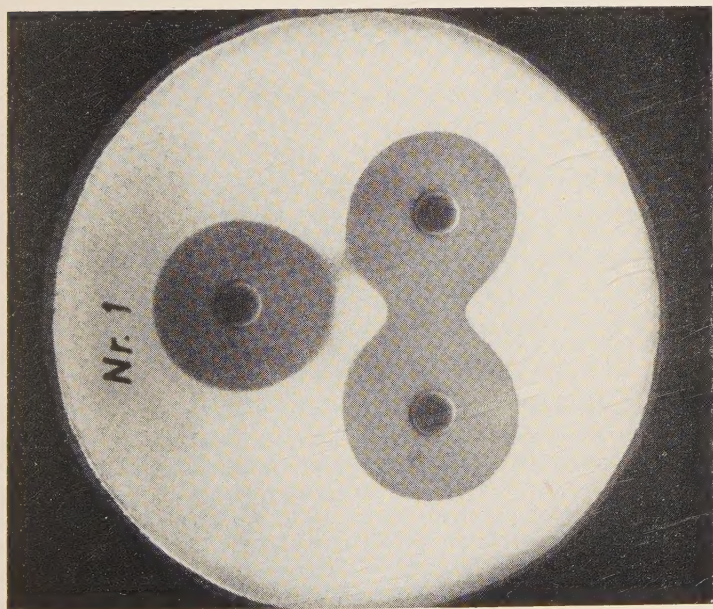


Abb. 2. Hemmwirkung des
Rindenextraktes von *Acer campestre*
auf *Bacillus subtilis*

Um eine gleichmäßige Diffusion der Stoffe auf den Testplatten zu erreichen, wurden die getesteten Platten eine Stunde im Eisschrank aufbewahrt und anschließend 12—14 Stunden im Thermostaten bei 32° C inkubiert.

Als Wirkungsmaß wurde der Durchmesser der Hemmhöfe in Millimeter bei bestimmter Konzentration (mg/ml) ermittelt und als biologische Aktivität angegeben („Agar-Diffusionstest“; 26). Dabei ist zu beachten, daß der Durchmesser des aufgelegten Filterpapierscheibchens mitgemessen wird (5 mm, bei Schleicher & Schüll-Papier 12 mm), also bereits den Nullwert darstellt.

2. Vorkommen, Hemmintensität und Grenzkonzentration der antibiotischen Stoffe bei zwölf Baumarten

a) Vorkommen der antibiotischen Stoffe

Nach dem angegebenen Ätherextraktverfahren wurden folgende Baumarten orientierend auf ihre antibiotische Hemmwirkung geprüft:

1. *Pseudotsuga menziesii* (Abb. 1)
2. *Picea abies*
3. *Fraxinus excelsior*
4. *Fagus silvatica*
5. *Tilia parvifolia*
6. *Robinia pseudoacacia*
7. *Ulmus montana*
8. *Populus* sp.
9. *Pinus silvestris*
10. *Aesculus rubicunda*
11. *Betula pendula*
12. *Acer campestre* (Abb. 2)

Dabei wurden bei einer Konzentration von 20 mg/ml Lösungsmittel von allen untersuchten Rindenextrakten Hemmzonen mit einem Durchmesser zwischen 11 und 26 mm gemessen.

b) Hemmintensität und Grenzkonzentration der antibiotischen Stoffe

Um die Hemmintensität und Grenzkonzentration der Rindenextrakte festzustellen, wurden drei verschiedene Versuchsserien durchgeführt; es wurden jeweils 100 g Rohmaterial mit der vierfachen Gewichtsmenge Extraktionsmittel zur Herstellung der Rohextrakte verwendet, wobei die Extraktionszeit von 25 Stunden konstant gehalten wurde. Nach der quantitativen Anteilsbestimmung an Rohextrakt wurde dieser nacheinander bei Konzentrationen von 20 mg/ml — 10 mg/ml — 5 mg/ml — 1 mg/ml — 0,5 mg/ml — 0,1 mg/ml auf seine Hemmwirkung geprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Biologische Aktivität der Rinden von zwölf verschiedenen Baumarten bei verschiedenen Rohextraktkonzentrationen

Rindenrohextrakt	20 mg/ml	10 mg/ml	5 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,1 mg/ml
1. <i>Pseudotsuga menziesii</i>	16	12	—	—	—	—
2. <i>Picea abies</i>	25	23	22	20	18	7
3. <i>Fraxinus excelsior</i>	26	23	21	19	19	9
4. <i>Fagus silvatica</i>	22	19	11	—	—	—
5. <i>Tilia parvifolia</i>	15	14	12	—	—	—
6. <i>Robinia pseudoacacia</i>	15	13	10	—	—	—
7. <i>Ulmus montana</i>	13	10	—	—	—	—
8. <i>Populus</i> sp.	11	7	—	—	—	—
9. <i>Pinus silvestris</i>	10	8	8	7	—	—
10. <i>Aesculus rubicunda</i>	14	12	—	—	—	—
11. <i>Betula pendula</i>	16	14	9	—	—	—
12. <i>Acer campestre</i>	11	—	—	—	—	—

Die Zahlen geben die Durchmesser der Hemmzonen in mm an.

Die in Tabelle 1 dargestellten Mittelwerte von drei Versuchsserien (am 31. 5. 60, 15. 6. 60 und am 30. 6. 60) zeigen die stärkste Hemmintensität bei *Fraxinus excelsior* (Abb. 3) und *Picea abies* (Abb. 4). Beide Baumarten geben im Agardiffusionstest bei Rohextraktkonzentrationen von 20 mg/ml Lösungsmittel die größten Hemmzonen von 26 bzw. 25 mm im Durchmesser. Die Grenzkonzentration, bei der eben noch eine antibakterielle Hemmwirkung nachweisbar ist, liegt bei diesen beiden Baumarten unter 0,1 mg/ml, bei den zehn anderen geprüften Baumarten zwischen 10 und 1 mg/ml also viel höher.

3. Einfluß von Temperatur und Alterung auf die Aktivität des Rohextraktes

a) Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Temperatur

Um den Einfluß der Temperatur auf die biologische Aktivität zu prüfen, wurden zehn voneinander getrennte Versuchsreihen mit Extrakten von *F. excelsior* durchgeführt (Sammelzeit des Materials und Durchführung der Versuche im Monat August 1960).

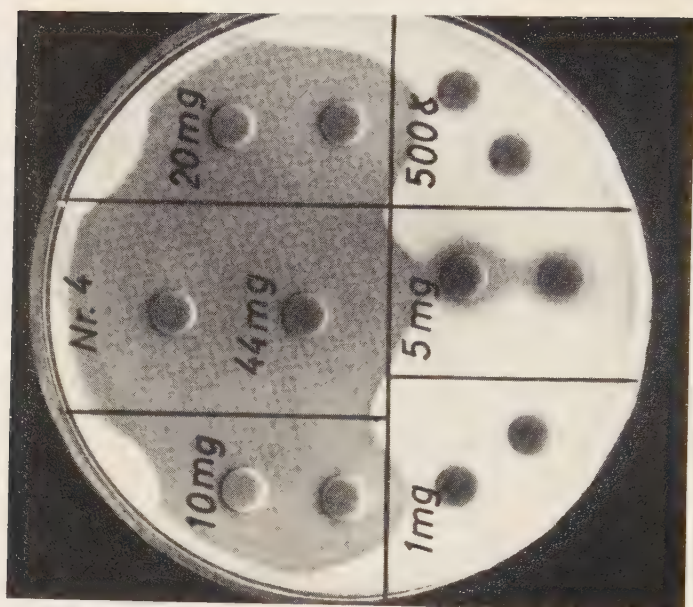


Abb. 3. Grenzkonzentrationsbestimmung
des Eschenrohextraktes

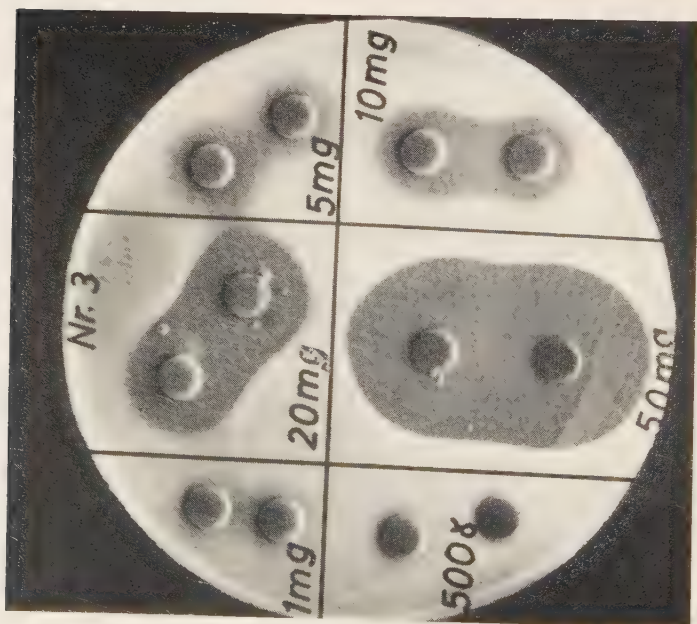


Abb. 4. Grenzkonzentrationsbestimmung
des Fichtenrohextraktes

Der Rohextrakt wurde bei einer gleichbleibenden Konzentration von 20 mg/ml im Wasserbad je 1 Stunde bei Temperatur von 20–110° C erwärmt und die biologische Aktivität nach dem Agardiffusionstest ermittelt. Die Diffusionszeit von je 1 Stunde der getesteten Platten wurde konstant gehalten (Abb. 5).

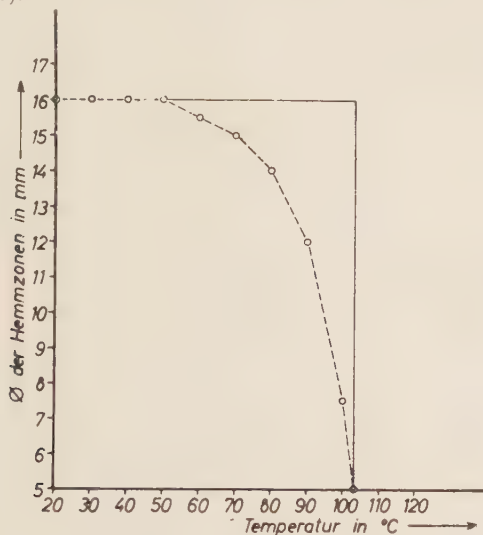


Abb. 5. Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Temperatur

Die Untersuchungen zeigen, daß die biologische Aktivität des Rohextraktes von *F. excelsior* bis zu 50° C konstante Hemmzonen von 17 mm im Durchmesser ergibt. Zwischen 50 und 70° C und zwischen 70 und 80° C nehmen die Durchmesser der Hemmzonen um je 1 mm ab. Bei einer Temperatur von 80–90° C nehmen die Hemmzonen um 4 mm, bei 100° C um 8,5 mm ab. Bei 103° C ist keine biologische Aktivität mehr nachweisbar.

Bei einer Temperatureinwirkung von über 50° C schlägt die Färbung des Rohextraktes von grün nach braun um.

b) Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Alterung des Rohextraktes

In sechs Versuchsserien (Sammelzeit der Rinde im Monat Mai 1960) wurde der Rohextrakt von *F. excelsior* mit einer Konzentration von 78,5 mg/ml bei einer Temperatur von –10° C zwei Monate lang konstant gehalten und jeden 15. Tag nach dem Agardiffusionstest die biologische Aktivität ermittelt, wobei die Diffusionszeit von 1 Stunde auf den Testplatten ebenfalls konstant gehalten wurde.

Nach 2 Monaten wurde die Temperatur geändert, der Rohextrakt 16 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt und jeden vierten Tag auf seine Aktivität, bei konstanter Konzentration und Diffusionszeit, geprüft.

Nach weiteren zweieinhalb Monaten wurde der Rohextrakt wiederum bei der Anfangstemperatur (–10° C) eineinhalb Monate gehalten und bei gleicher Konzentration und Diffusionszeit die biologische Aktivität ermittelt.

Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, wurde der Rohextrakt von *F. excelsior* 121 Tage der Alterung ausgesetzt. In dieser Zeit wurde der Extrakt 60 Tage bei -10°C gehalten. Die während dieser Zeitdauer durchgeführten Probestests ergaben in jedem Fall eine konstante Hemmzone von 40 mm Durchmesser. Bei der anschließenden 16tägigen Aufbewahrung des Rohextraktes bei Zimmertemperatur nahm der Durchmesser der Hemmzonen von 40 auf 26 mm ab. Bei der weiteren 45tägigen Auf-

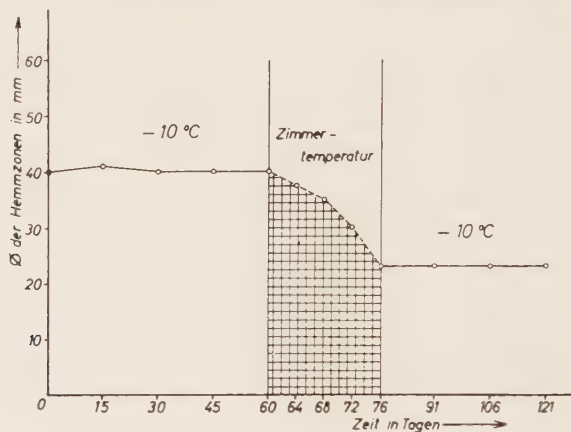


Abb. 6. Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Alterung des Rohextraktes

bewahrung des Extraktes bei wiederum -10°C blieb der erhaltene Wert von 26 mm konstant. Wie bei einer Temperatureinwirkung von über 50°C schlägt auch bei einer längeren Extraktaufbewahrung bei Zimmertemperatur die Farbe des Extraktes von grün nach braun um.

Der aus der Eschenrinde gewonnene Rohextrakt ist also bei Temperaturen von über 50°C und bei Alterung auch in Zimmertemperatur aktivitätslabil. In beiden Fällen nimmt die biologische Aktivität ab und seine Farbe schlägt von grün nach braun um.

Die biologische Aktivität des Rohextraktes nimmt im alkalischen Medium ebenfalls stark ab, auch hier schlägt die Farbe um. Dieser Vorgang ist reversibel. Beim Ansäuern auf p_{H} 3 nimmt der Extrakt seine ursprüngliche Farbe wieder an und die Hemmaktivität nimmt zu.

C. Hauptversuche: Isolierung der *Bacillus subtilis*-Hemmstoffe aus der Eschenrinde

1. Material und Methodik der Rohextraktgewinnung

Der Rindenrohextrakt wurde, wie unter B/1 beschrieben, gewonnen. Anstelle von Diäthyläther wurde jedoch mit 96 %igem Äthylalkohol 24 Stunden im Eisschrank bei einer Temperatur von -1 bis -2°C extrahiert.

Für eine präparative Rohextraktgewinnung hat sich nämlich Äthylalkohol als Extraktionsmittel gegenüber Diäthyläther besser bewährt. Auf diese

Weise wurde, wie Tabelle 2 zeigt, eine größere Rohextrakt-Ausbeute erhalten.

Die rotbraune alkoholische Lösung des Rohextraktes wurde auf der Nutsche abfiltriert, um feste Rückstände des Ausgangsmaterials zu beseitigen, und am rotierenden Vakuumverdampfer bei einer Temperatur von 40–50° C eingeeengt. Der so gewonnene Rohextrakt ist eine braun gefärbte, klebrige, viskose Masse von bitterem Geschmack. Der p_{H} -Wert liegt im sauren Bereich.

2. Chemische Aufarbeitung des Rohextraktes

Der Rohextrakt wurde nach zwei verschiedenen Verfahren chemisch aufgearbeitet.

a) Ausschüttel-Verfahren

Zur weiteren Reinigung des Rohextraktes und zur Anreicherung der aktiven Stoffe wurde der braun gefärbte Rohextrakt mit dest. Wasser aufgenommen und die wäßrige Lösung im Scheidetrichter mit den Lösungsmitteln Benzol, Chloroform, Äther, Essigester und Aceton ausgeschüttelt. Dabei wurde in der Ätherphase die größte Anreicherung der aktiven Stoffe erzielt. Die ätherische Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Nach Aufnahme in Äther traten Niederschläge auf, die durch Zentrifugieren von dem aktiven ätherlöslichen Teil abgetrennt wurden.

Der aktive lösliche, vorgereinigte Rohextrakt ergab nach der Verdampfung des Lösungsmittels und anschließenden Trocknung bis Gewichtskonstanz im Vakuum-Exsikkator eine Ausbeute von 0,308–0,535 % der Frischrinde. Er war gelbgrün gefärbt und von klebriger Konsistenz. Aus der wäßrigen, nicht aktiven Lösung schieden sich beim Einengen kristalline Stoffe aus (vgl. S. 36).

Bei der direkten Ätherextraktion (vgl. B/1 a) wurde nach der Verdampfung des Lösungsmittels und der Trocknung des Rohextraktes eine Ausbeute von nur 0,18–0,25 % der Frischrinde erhalten.

Der folgende Versuch zeigt die Ergebnisse der Mittelwerte von 10 Versuchsreihen:

Versuch:

Zur Feststellung der Rohextrakt-Ausbeute wurden 24 g Material in 400 ml 96 %igem Äthylalkohol 24 Stunden bei einer Temperatur von –1 bis –2° C extrahiert, und so wurde vorgereinigter Rohextrakt erhalten (vgl. S. 4).

Tabelle 2

Rohextrakt, extrahiert mit	Gewicht des getrockneten Rohextraktes in mg	Konzentration in mg/ml	Hemmzonen in mm	Ausbeute in % (bezogen auf frische Rinde)
Äthylalkohol (96 %)	70	32	22–28	0,308
Äther	49	24	15–16	0,206

Parallel zu diesem Versuch wurden ebenfalls 24 g Material in 400 ml Diäthyläther 24 Stunden extrahiert (vgl. B/1 a).

Zur weiteren chemischen Aufarbeitung des durch Ausschütteln mit Äther vorgereinigten aktiven Rohextraktes wurde eine konzentrierte ätherische Lösung hergestellt und diese tropfenweise mit Petroläther (30–50° C) verdünnt, bis eine weiße Trübung entstand. Die dabei ausfallenden Stoffe wurden fraktioniert aus der Lösung mit Petroläther ausgefällt und durch Zentrifugieren oder durch adsorptive Filtration auf der Stärkesäule vom petrolätherlöslichen, nicht aktiven Teil getrennt. Der so gewonnene amorphe, aktive Stoff wurde mehrmals mit Petroläther ausgewaschen, mit Aceton oder Essigester aufgenommen und die erhaltene klare, gelblichweiße Lösung zum Analysengang verwendet. Die Ausbeute betrug 0,12 % des Rohextraktes und 0,015 % der Frischrinde.

Tabelle 3

Fraktion		Verdampfungs- rückstand in mg	% Ausbeute bezogen auf Rohextrakt	Konzentration in mg/ml	Hemmzone in mm
Rohextrakt mit Alkohol extrahiert: 18,2 g (12,1 % bezogen auf Rinde)	H ₂ O- Phase	17 630	97,41	810	—
	Äther- Phase	253	1,39	63	25—28

Die in den Tabellen 3 und 4 angegebenen Mittelwerte von 12 Versuchen zeigen die Ergebnisse des folgenden quantitativen Analysenganges:

Versuch:

150 g Ausgangsmaterial wurden in 1,1 l Alkohol 24 Stunden bei einer Temperatur von –1° C extrahiert.

Die alkoholische Rohextraktlösung wurde zur Trockne eingengt, in 50 ml dest. Wasser aufgenommen und dreimal im Scheidetrichter mit jeweils 300 ml Äther ausgeschüttelt. Der Verdampfungsrückstand der ätherischen Phase war im Agardiffusionstest mikrobiologisch aktiv und

Tabelle 4

Fraktion		Verdampfungs- rückstand in mg	% Ausbeute bez. auf Rohextrakt	Konzentration in mg/ml	Hemmzone in mm
Rückstand der ätherischen Phase 253,33 mg	Lösung	230	1,26	230	—
	Rück- stand	23	0,12	10	25—29

ergab eine Ausbeute von 253 mg. Die wäßrige Phase besaß keine biologische Aktivität.

Die ätherische Phase wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und mit 5–10 ml peroxyd- und wasserfreiem Äther aufgenommen. Dann wurde tropfenweise absoluter Petroläther (30–50° C) zugesetzt, bis eine flockenartige amorphe Substanz ausfiel. Der weitere Analysengang wurde nach der angegebenen Methode ausgeführt (s. S. 11).

b) Soxhlet-Verfahren

Um eine zweite Möglichkeit, den Rohextrakt an biologisch wirksamen Substanzen anzureichern zu untersuchen, wurde der mit Äthanol gewonnene Extrakt im Vakuum-Exsikkator getrocknet, im Mörser pulverisiert und im Soxhlet die ersten 5–6 Stunden mit Petroläther, dann noch weitere 6 Stunden mit Äther p.a. bei einer Temperatur von 40–50° C extrahiert. Der nach der Verdampfung der Petroläther-Fraktion gewonnene grün gefärbte, ölige Rückstand war im Agardiffusionstest nicht aktiv und wurde verworfen. Die Äther-Fraktion enthielt die Hemmstoffe. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde der Rückstand getrocknet und zweimal mit Petroläther nachgewaschen. Der so gewonnene biologisch aktive Extrakt war wiederum, wie im 1. Verfahren angegeben, gelbgrün gefärbt, von klebriger Konsistenz und hatte einen bitteren Geschmack. Der pH-Wert schwankte zwischen 4,9 und 5,8.

Tabelle 5

Fraktion	Gewicht des trockenen Rohextraktes in mg	% Ausbeute bez. auf Rohextrakt	Extraktkonzentration in mg/ml	Hemmzone in mm	Bemerkung
1. Petroläther (40–60° C + 80 bis 100° C)	361,60	1,8	180,80	—	tiefgrün
2. Äther	160	0,85	80	28–32	gelbgrün
3. Alkohol (96 %)	18 000	97,2	18 000	—	tief rotbraun

Der nicht im Äther extrahierbare tief rotbraune Rückstand wurde mit Äthylalkohol bei 60–70° C extrahiert.

Nach dem Erkalten der Lösung fielen weiße, nadelförmige Kristalle aus, die von der rotbraun gefärbten Mutterlauge auf der Nutsche abgetrennt, mit kaltem Alkohol ausgewaschen und bei 100° C getrocknet wurden. Die Kristalle und die Mutterlauge wurden getrennt getestet. Beide sind biologisch nicht aktiv. Die Kristalle wurden in großer Ausbeute aus der Frischrinde und nur während der Vegetationsruhe in vitro erhalten. Die Ausbeute an kristalliner Substanz betrug 0,37 % der Rinde (s. S. 36).

Im folgenden quantitativen Versuch werden die Ergebnisse der Mittelwerte von 15 Versuchen angegeben:

Versuch :

150 g Ausgangsmaterial wurden in 1,1 l Alkohol extrahiert, der Extrakt im Exsikkator getrocknet und anschließend pulverisiert. Die Ausbeute betrug 18,524 g (12,3 % bezogen auf Frischrinde). 18,524 g wurden im Soxhlet mit 500 ml Petroläther (40–60° C und 80–100° C im Verhältnis 1 : 1) mit 500 ml Äther je 6 Std. bei 50° C und mit Alkohol (96 %) 2 Std. bei einer Temperatur von 70° C extrahiert.

Bei der weiteren Aufarbeitung wurde die getrocknete, aktive Ätherfraktion mit 5–7 ml dest. Wasser, das auf 50–60° C erwärmt war, mit Zusatz von Aceton aufgenommen. Die wäßrige Suspension wurde von Aceton im Vakuum befreit und erschöpfend im Scheidetrichter mit Äther ausgeschüttelt, wobei die gesamten aktiven Stoffe in die Ätherphase übergingen. Die Farbe dieser Phase war schwach gelbgrün und zeigte im biologischen Test eine hohe Hemmaktivität. Aus dem gewonnenen Extrakt wurde eine Ausbeute von 0,059–0,066 %, bezogen auf die frische Rinde, erhalten.

Die wäßrige Phase war mikrobiologisch nicht aktiv und wurde verworfen.

Versuch zur quantitativen Analyse

160 mg Extrakt wurden mit 50 ml H₂O und einigen Tropfen Aceton aufgenommen. Die von Aceton befreite wäßrige Lösung wurde dreimal mit je 200 ml Äther ausgeschüttelt.

Tabelle 6

Phase	Trockengewicht in mg	Konzentration in mg/ml	Hemmzone in mm	% Ausbeute bezogen auf Roh- extrakt (18,524 g)
Wasser	83	41,62	—	0,44
Äther	75	34,54	27—31	0,40

Im folgenden werden die biologisch aktiven Stoffe aus der Ätherphase als „aktive Stoffe“ bezeichnet.

Tabelle 7. Ausbeuten an aktiven Stoffen durch die verschiedenen Reinigungsmethoden

Methode	eingesetzter Rohextrakt in mg	Ausbeute an aktiven Substanzen in mg	Ausbeute in % bezogen auf Rohextrakt
a) Ausschüttel- verfahren	18 200	23,21	0,12
b) Soxhlet- verfahren	18 524	75,09	0,40

3. Verteilungschromatographische Aufarbeitung der aktiven Stoffe

Die aktiven Stoffe wurden der Verteilungschromatographie unterworfen, wobei als stationäre Phase Phosphat-Pufferlösung an Kieselgur, als mobile Phase die in Tab. 8 angegebenen organischen Lösungsmittel verwendet wurden.

Die Säule (vgl. Abb. 7) bestand in der Unterschicht aus 10 g Kieselgur, die mit 7 ml 0,3 mol. Phosphatpuffer ($p_H = 5,8$) gut durchmischt war, in der Oberschicht aus 5 g Kieselgur, 3,5 ml 0,3 mol. Phosphatpuffer und den aktiven Stoffen (nach JUNG und PLEMPER).

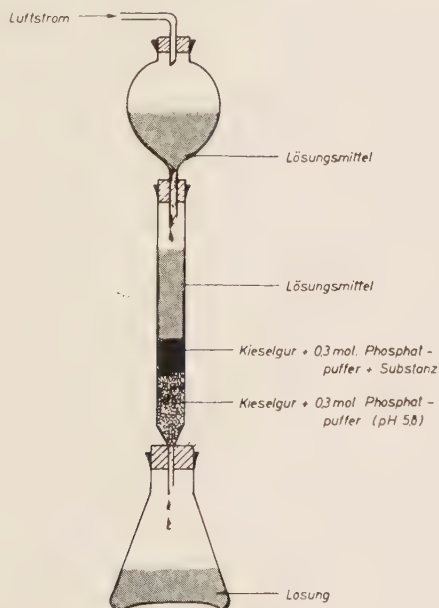


Abb. 7. Schema der fraktionierten Verteilungschromatographie.

Ober- und Unterschicht wurden hintereinander in eine 38 cm lange und 1,8 cm i. D. weite Chromatographieröhre gestopft und die aktiven Substanzen mit der 200fachen Gewichtsmenge Lösungsmittel nach der elutropen Reihe (Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Chloroform, Äther, Essigester, Aceton) verteilt. Die Wanderungsgeschwindigkeit wurde durch Überdruck, etwa 30–50 Tropfen/Min., geregelt. Die einzelnen Fraktionen wurden in Vorlagen aufgefangen und auf ihre biologische Aktivität geprüft. In Tabelle 8 wird eine quantitative verteilungschromatographische Analyse wiedergegeben.

Versuch :

400 mg des armorphen, nach Methode C/2 a gereinigten aktiven Stoffes wurden chromatographisch in 20 Fraktionen verteilt, wobei als mobile Phase stets chemisch reine, wasserfreie und frisch destillierte Lösungsmittel verwendet wurden. (Das Material wurde im Monat August 1961 gesammelt und stammt aus dem Forstbotanischen Garten in Grafrath.)

Tabelle 8

Fraktion	Lsm. ml	Wanderungs- geschwindig- keit Tropf. min	Trocken- gewicht in mg	Hemm- zone in mm	aktive Fraktion	Bemerkung
1. Petroläther (100° C)	40	22—25	82,75	0,00		grün ölig
2. Petroläther (100° C)	40	22—25	16,95	0,00		grüngelb ölig
3. Tetrachlor- kohlenstoff	40	36—38	11,65	0,00		grüngelb ölig
4. "	40	36—38	5,43	0,00		"
5. "	40	36—38	1,30	0,00		farblos pulv.
6. "	40	36—38	12,47	0,00		"
7. Benzol	40	34—35	11,09	10,00	I	gelbgrün ölig
8. "	40	34—35	0,24	0,00		farblos
9. Chloroform	40	45—46	8,9	0,00		gelbgrün ölig
10. "	40	45—46	14,17	20,00	II	"
11. "	40	45—46	7,21	26,00		hellgelb ölig
12. "	40	45—46	3,79	0,00		"
13. Äther	40	45—46	18,97	19,00	III	"
14. "	40	45—46	9,15	30,00		"
15. "	40	45—46	1,3	0,00		farblos
16. Essigester	40	48—50	29,01	16,00		hellgelb klebrig
17. "	40	48—50	8,05	26,90	IV	farblos klebrig
18. "	40	48—50	21,31	22,00		"
19. "	40	48—50	2,85	0,00		farblos
20. Aceton	100	48—50	22,50	0,00		grün ölig

Die einzelnen Fraktionen wurden nach dem Trocknen mit 1 ml Äther aufgenommen und auf ihre Hemmwirkung auf *B. subtilis* durch Agardiffusions-test ermittelt.

Nach der verteilungschromatographischen Aufarbeitung der aktiven Stoffe zeigten die Benzol-, Chloroform-, Äther- und Essigester- ein positives, die Petroläther-, Tetrachlorkohlenstoff- und Acetonfraktion ein negatives Ergebnis.

Die in der Säule festgehaltene Substanz wurde nach dem Ausleeren aus der Säule mit abs. Methanol eluiert und auf ihre Hemmwirkung geprüft. Sie erwies sich im Agardiffusionstest negativ.

Im folgenden werden die Hemmstoffe der aus der Benzolfraktion als Hemmstoff I, aus der Chloroformfraktion als Hemmstoff II, aus der Ätherfraktion als Hemmstoff III und aus der Essigesterfraktion als Hemmstoff IV bezeichnet.

4. Reinigung der aktiven Fraktionen

a) Papierchromatographische Isolierung und Reindarstellung von Hemmstoff I

Die Benzolfraktion (11 mg) wurde nach Verdampfen des Benzols und Trocknen im Vakuumexsikkator mit 2–3 ml Äther aufgenommen und auf Chromatographie-Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) streifenförmig aufgetragen. Als mobile Phase wurde Butanol-H₂O-25 %iges NH₃ im Verhältnis 8 : 1 : 1 verwendet. Nach 5stündiger Lauf-

Tabelle 9. Ausbeuten der Hemmstoffe nach Verteilungschromatographie

Hemmstoff	eluiert mit	gereinigte akt. Subst. mg	Ausbeute in % bezogen auf aktive Subst.	Ausbeute in % bezogen auf Rinde
I	Benzol	11,09	2,7	0,001 37
II	Chloroform	21,38	5,3	0,002 6
III	Äther	28,12	7,03	0,003 5
IV	Essigester	58,37	14,5	0,007 2

zeit entstanden zwei gefärbte Banden, eine schwach gelbe und eine graugelbe, mit den R_F -Werten 0,39 und 1,0. Im UV-Licht waren zwei weitere Banden sichtbar, eine grau fluoreszierende Bande mit einem R_F -Wert von 0,51 und eine blau fluoreszierende mit dem R_F -Wert 0,39. Im Agardiffusionstest war die grau fluoreszierende Bande mit dem R_F -Wert 0,51 aktiv. Sie wurde mit Methanol-Äther im Verhältnis 1 : 2 vom Papier eluiert und das Eluat zur Trockne im Vakuumexsikkator eingengt. Dabei bildeten sich am Rande des Glaskolbens große zweig- bis büschelförmige, farblose Kristalle. Zur Umkristallisation wurden diese mit Benzol oder CHCl₃ aufgenommen und einige Tropfen Petroläther (30–40° C) zugesetzt. Nach 1–2wöchigem Stehenlassen im Eisschrank fielen zweigförmige, farblose Kristalle aus, die eine hohe biologische Aktivität besaßen. Ihre Mutterlauge war biologisch nicht aktiv und enthielt keine weiteren Stoffe. Die Ausbeute aus der präparativen papierchromatographischen Trennung betrug 1–2 % der aktiven Stoffe. Im Agardiffusionstest wurden bei einer Konzentration von 100 γ /ml Lösungsmittel Hemmhöfe von 15–20 mm im Durchmesser erhalten. Weitere Eigenschaften der isolierten Substanz sind in Abschnitt 8 a zusammengestellt.

b) Reinigung des Hemmstoffes III

Der Hemmstoff aus der Ätherfraktion wurde chromatographisch an wasserfreiem Calciumsulfat und Kieselgur im Verhältnis 1 : 1 aufgetrennt. Zur Herstellung der Säule wurden 7 g Kieselgur und 7 g Calciumsulfat in einem Becherglase mit Chloroform zu einer Suspension vermischt, in eine 30 cm lange und 1,8 cm i. D. weite Chromatographie-röhre langsam eingegossen und mit einem Stopfer gleichmäßig festge-

drückt. So wurde eine riß- und blasenfreie Säule erhalten und die Suspension vom überschüssigen Lösungsmittel befreit. Die getrocknete Analysensubstanz wurde in 2–3 ml Chloroform aufgenommen und in die Säule eingefüllt. Beim Auswaschen mit Chloroform geht der Hemmstoff III in das Filtrat. Die nicht aktiven, schwach gelb gefärbten Begleitstoffe werden an der oberen Säulenzone stark adsorbiert. Es wurde in diesem Falle unter Normaldruck gearbeitet; die Zeitdauer des Versuchs belief sich auf 20–25 Stunden. Der Verdampfungsrückstand des Chloroformfiltrates wurde mit Äther aufgenommen und unter Zusatz von Petroläther (30–50°) zur Auskristallisation in den Eisschrank gestellt. Die so erhaltenen weißen Kristalle, etwa 22 mg, ergaben im Agardiffusionstest bei einer Konzentration von 20 mg/ml Hemmzonen zwischen 27–38 mm i. D. Die Ausbeute betrug etwa 4,5 % der aktiven Stoffe.

Bei einem weiteren Versuch wurden 33,3 mg des nach der verteilungs-chromatographischen Trennung gewonnenen Verdampfungsrückstandes der Ätherfraktion an wasserfreiem CaSO_4 und Kieselgur im Verhältnis 1 : 1 wie angegeben chromatographiert und mit folgenden Lösungsmitteln der Reihe nach ausgewaschen.

Tabelle 10

Fraktion	Lösungs- mittel- menge in ml	Verdamp- fungs- rückstand in mg	Hemmzone in mm
1. Chloroform	150	23,45	27
2. Chloroform	150	6,14	—
3. Äther	150	—	—
4. Aceton	150	2,21	—
5. Methyl- alkohol	150	—	—

Die Konzentrationen der Testlösungen entsprechen den Trockengewichten der Rückstände pro ml Lösungsmittel (Äther).

c) Reinigung von Hemmstoff II

Die Chloroformfraktion wurde im Vakuum zur Trockne eingengt, mit peroxyd- und H_2O -freiem Äther aufgenommen und die ätherische Lösung mit 2n HCl ausgeschüttelt. Die HCl-Phase zeigte nach der Verdampfung der Säure und der anschließenden Trocknung auf CaCl_2 und KOH im Vakuumexsikkator keine biologische Aktivität und wurde verworfen. Zur Beseitigung der Salzsäurespuren von der aktiven ätherischen Phase wurde diese bis zur Neutralreaktion mit dest. Wasser ausgeschüttelt und nach der Verdampfung des Äthers adsorptionschromatographisch an Al_2O_3 nach BROCKMANN gereinigt.

Zur Herstellung der Säule wurden 20–30 g Al_2O_3 in einem Becherglase mit peroxyd- und H_2O -freiem Äther zu einer Suspension vermischt und in eine 30 cm lange und 1,8 cm i. D. weite Chromatographieröhre

so eingegossen, daß die Säule keine Luftblasen oder Risse aufwies. Die getrocknete Analysensubstanz wurde in 5–10 ml Äther gelöst, in die Säule eingefüllt und mit Äther ausgewaschen.

Die Ergebnisse der adsorptionschromatographischen Analyse werden in Tabelle 12 wiedergegeben. Es wurden von 3 kg Ausgangsmaterial 1,762 g Verdampfungsrückstand der Chloroformfraktion erhalten.

Die aktiven Fraktionen wurden einzeln auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043b) punkt- oder streifenförmig aufgetragen und in der Lösungsmittelkombination Propanol-H₂O-NH₃ (25 %) im Verhältnis 8 : 1 : 1 aufsteigend verteilt. Nach 60stündiger Laufzeit waren 5–6 verschiedene Zonen zu erkennen, von denen diejenige mit einem R_F-Wert von 0,98 biologisch aktiv war. Sie war gelb gefärbt und im UV-Licht blau fluoreszierend. Bei der weiteren Aufarbeitung der aktiven Zone nach der Elution mit Methanol-Wasser im Verhältnis 1 : 1 zeigte sich,

Tabelle 12

Fraktion	Lösungs- mittel- menge in ml	Hemmzone in mm	Verdamp- fungs- rückstand in mg	Bemerkung über das Filtrat
1. Äther	300	—	24	farblos
2. Äther	200	—	21	farblos
3. Aceton	100	30	58	farblos
4. Aceton-Methanol 3 : 1	100	40	62	eine gelbe Bande aufge- löst farbloses Filtrat
5. Aceton-Methanol	100	25	70	farblos
6. Aceton-Methanol 3 : 2	100	15	27	farblos
7. Aceton-Methanol 2 : 2	120	14	87	farblos
8. Aceton-Methanol 1 : 3	100	30	30	grüngelb
9. Aceton-Methanol	200	10	28	grüngelb
10. Methanol	100	28	24	grüngelb
11. Methanol	100	30	85	grüngelb
12. Methanol	100	30	21	grüngelb
13. Methanol	100	28	30	grüngelb
14. Wasser	100	48	123	gelbe Bande ausgelöst
15. Wasser	100	30	90	grüngelb
16. Wasser	500	28	62	grüngelb
17. Wasser	500	—	28	grüngelb

Die Konzentrationen der Testlösungen entsprechen der Hälfte der Verdampfungsrückstandsgewichte pro ml Lösungsmittel.

daß die Substanz nicht rein war, sondern daß eine oder mehrere Substanzen als Begleitstoffe vorhanden waren, die bisher nicht abgetrennt werden konnten.

d) Reinigung von Hemmstoff IV

α . Reinigung über saurem Aluminiumoxyd

Der Hemmstoff IV der Essigesterfraktion wurde austauschchromatographisch auf saurem Aluminiumoxyd weiter gereinigt.

Zur Herstellung der Säule wurden 20 g neutrales Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufe I mit 20 ml 0,1 n Salzsäure gemischt und bei 150° C getrocknet. Das so gewonnene saure Aluminiumoxyd wurde mit abs. Benzol vermischt und die Suspension in die Säule (30 cm lang und 1,8 cm i. D.) eingefüllt. Die Substanz (6 mg) wurde mit 1–2 ml Benzol aufgenommen, auf die Säule gegossen und mit 10 ml Benzol ausgewaschen. Es wanderte eine gelb gefärbte Bande bis in die Mitte der Säule, die mit Benzol-Äther im Verhältnis 1 : 1 eluiert wurde. Das Eluat war schwach gelb-braun gefärbt. Eine zweite tiefbraun gefärbte Bande war zu diesem Zeitpunkt etwa ca. 1 cm gewandert und konnte bei weiterem Auswaschen mit derselben Lösungsmittelkombination eluiert werden. Weiterhin wurde nacheinander mit den Lösungsmitteln Äther, Essigester und Aceton ausgewaschen, durch die aber keine gefärbten Stoffe abgetrennt werden konnten. Das Eluat der Essigesterfraktion zeigte im Agardiffusionstest ein positives Ergebnis. Die weitere Reinigung des aktiven Stoffes erfolgte papierchromatographisch. Die weitgehend vorgereinigte Substanz wurde auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b) streifenförmig aufgetragen und im System Petroläther-Äther-Äthanol (5 : 5 : 1) drei Stunden entwickelt. Es war unter UV-Licht keine Bande sichtbar. Nach dem Trocknen wurde ein Streifen des Chromatogramms in 5 cm breite Streifen aufgeteilt, auf *Subtilis*-Platten gelegt und 4 Stunden im Eisschrank aufbewahrt. Anschließend wurde das Papier entfernt und die Platte 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Auf der *Subtilis*-Platte konnte eine Bande mit einem R_F -Wert von 0,83 nachgewiesen werden. Die Bande wurde mit Essigester-Methanol (1 : 1) eluiert. Der eluierte Stoff daraus war hoch aktiv.

In Essigester fällt bei Zusatz von Petroläther (30–50°) ein weißer, amorpher Stoff, fallen aber keine Kristalle aus. Die eluierte, aktive Substanz wurde im Vakuumexsikkator gut getrocknet, mit peroxyd- und H₂O-freiem Äther aufgenommen und die ätherische Lösung im Vakuumexsikkator langsam verdampft. Dabei bildeten sich am Kolbenrand Sphärolithen (43) vom Schmelzpunkt 93–94° C (vgl. Abb. 8 und 9).

Im quantitativen Versuch wurden 6 mg der an Kieselgur erhaltenen Essigesterfraktion an 20 g saurem Al₂O₃ gereinigt. Dabei wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

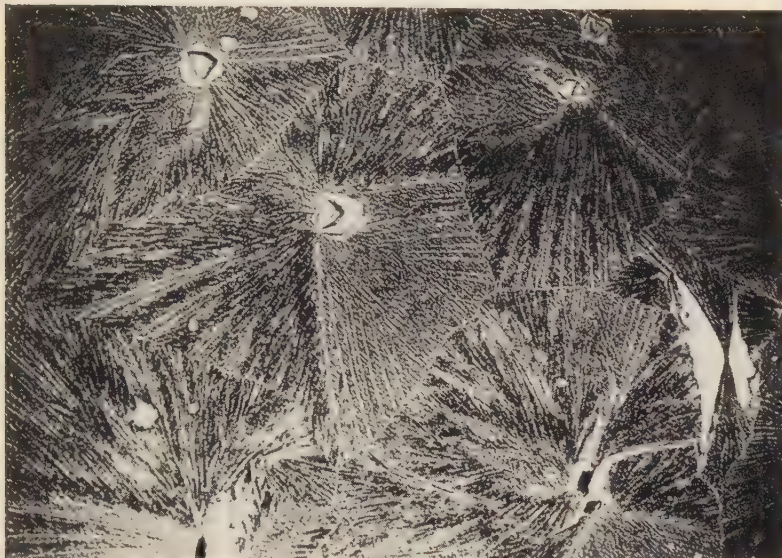


Abb. 8. Nach dem Verdampfen
der ätherischen Lösung entstehende
Sphärolithe von Hemmstoff IV (57 $\times$)



Abb. 9. Nach dem Erstarren des
Sublimats entstehende Sphärolithe
von Hemmstoff IV (57 $\times$)

Tabelle 11

Fraktion	Lösungsmittelmenge in ml	Hemmzone in mm	Verdampfungsrückstand in mg	Konz. in mg/ml
1. Benzol	200	—	1,55	0,38
2. Benzol-Äther 1 : 1	200	—	1,35	0,33
3. Benzol-Äther 1 : 2	200	—	1,09	0,27
4. Äther	200	—	—	—
5. Essigester	200	18 (sekundär 32)	1,2	0,30
6. Aceton	200	—	0,59	0,14

β. Reinigung über Calciumphosphat

Die bei einem weiteren verteilungschromatographischen Versuch (aus 2 kg Frischrinde, Sammelzeit: September) gewonnene aktive Essigesterfraktion (144 mg) wurde auf einer Calciumphosphat-Säule weiter gereinigt. Zur Herstellung der Säule wurden 20 mg Calciumphosphat p.a. mit absolutem Benzol zu einem Brei vermischt, in eine 30 cm lange und 1,8 cm (i. D.) weite Chromatographieröhre eingefüllt und mehrmals mit Benzol ausgewaschen. Das Substanzgemisch wurde mit Benzol aufgenommen und auf die Säule gebracht. Bei Elution mit 100 ml Benzol entstanden zwei gefärbte Banden. Eine schwach gelbgrün gefärbte wurde mit Äther eluiert. Sie war nicht aktiv und wurde verworfen. Als weiteres Elutionsmittel wurde Aceton verwendet. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels entstanden, wie schon beschrieben, Sphärolithen-Kristallstrukturen vom Schmelzpunkt 93–94° C (Ausbeute 46 mg, etwa 0,0023 % der Frischrinde). Die isolierte aktive, kristalline Substanz erwies sich schon bei einer Konzentration von 25 γ/ml aktiv und bildete primäre Hemmhöfe von 10–18 mm und sekundäre von 20–32 mm Ø, die nach einwöchigem Stehenlassen der Platte bei Zimmertemperatur entstanden.

Die Sphärolithen-Kristallstrukturen ergaben bei der Elementaranalyse aus 4,141 mg Substanz 10,49 mg CO₂, 2,68 mg H₂O

C₈H₁₀O₂ : 138

Gef.: C = 69,13 %, H = 7,24 %

Ber.: C = 69,54 %, H = 7,29 %

Molekulargewichtsbestimmung nach RAST in Campher

1,356 mg Substanz in 13,949 mg Campher (K = 36) t = 23,7

Molekulargewicht Gef.: 148

Molekulargewicht Ber.: 138

In Abb. 10 wird der Gesamtanalysengang chematisch dargestellt.

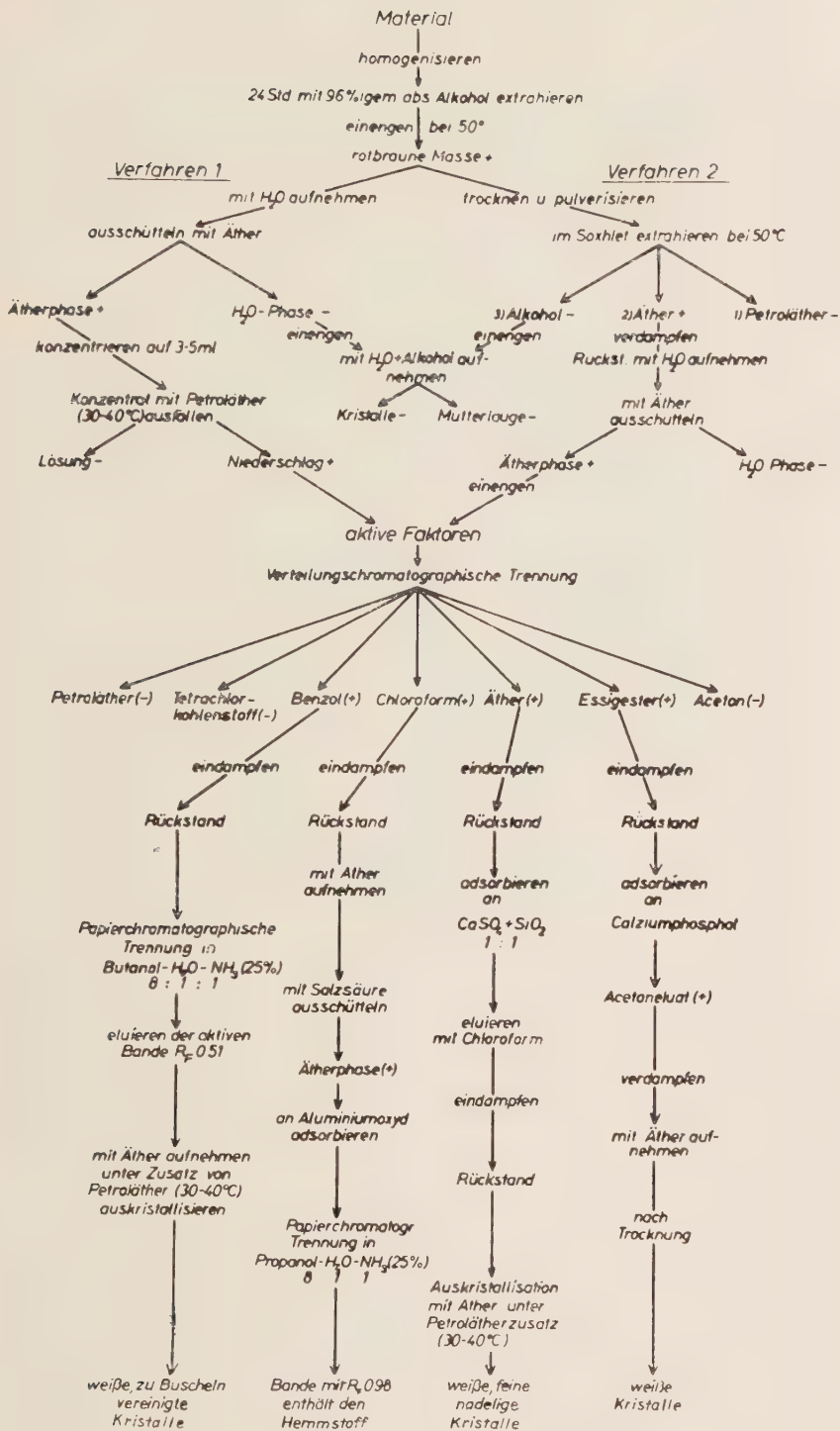


Abb. 10. Schematische Darstellung des Analysenganges.

5. Papierchromatographischer Reinheitstest des Hemmstoffes I und III

Zur Prüfung der aus der Eschenrinde in Kristallform gewonnenen Antibiotika auf ihre Einheitlichkeit wurde der Reinheitstest nach der papierchromatographischen Methode durchgeführt. Es wurden 2%ige Lösungen von den kristallisierten Substanzen hergestellt, auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043 b) punktförmig aufgetragen und mit verschiedenen Lösungsmittelkombinationen aufsteigend chromatographiert, wobei sich für die einzelnen Hemmstoffe folgende Lösungsmittelkombinationen gut eigneten:

für den Hemmstoff I n-Butanol-H₂O-25 %iges NH₃ (8 : 1 : 1)

für den Hemmstoff III n-Butanol-Essigsäure-H₂O (50 : 2 : 48).

Hemmstoff I wurde in dem erwähnten Fließmittel 5 Stunden aufsteigend behandelt, wobei auf dem Chromatogramm nur ein im UV-Licht grau fluoreszierender Fleck mit dem R_F-Wert 0,51 zu erkennen war. Nach der Quadratmethode (Biotest, ausgeführt mit Papierquadraten) konnte im Agardiffusionstest der gleiche Fleck mit dem R_F-Wert 0,51 an der Testplatte sichtbar gemacht werden.

Hemmstoff III zeigte nach einer 19stündigen Laufzeit in n-Butanol-Essigsäure-H₂O, 50 : 2 : 48, ebenfalls einen einzigen, im UV-Licht blauviolett fluoreszierenden Fleck, der im Agardiffusionstest aktiv war und einen R_F-Wert von 0,91 hatte.

6. Sekundäre Hemmhöfe bei Hemmstoff IV

Nach den verteilungschromatographischen Untersuchungsergebnissen konnten in der Eschenrinde vier antibiotische Stoffe mit verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften nachgewiesen werden, was inzwischen auf anderem Wege von JUNG und ENDRES (unveröffentlicht) bestätigt wurde. Ihre Trennung wurde durch die verschiedenen Verteilungskoeffizienten der einzelnen Hemmstoffe möglich. Während bei den Hemmstoffen I, II und III im Agardiffusionstest stets nur ein Hemmhof ausgebildet wurde, konnten beim Hemmstoff IV an der Peripherie der primären Hemmhöfe sekundäre und tertiäre Höfe (Abb. 11) beobachtet werden. Dies Phänomen beruht darauf, daß bei der Primärhemmhofbildung das Wachstum der Bakterien verhindert wird, während sekundäre und tertiäre Hemmhofbildungen darauf zurückgeführt werden können, daß die Proteine der auf der Testplatte bereits gewachsenen Bakterien aufgelöst werden. Demnach sind die Hemmstoffe I, II und III als bakteriostatisch zu bezeichnen, während der Hemmstoff IV auch als lytisch wirksames Antibiotikum auftritt.

7. Eine neue Isolierungsmethode für den Hemmstoff IV

Da spätere Untersuchungen gezeigt hatten, daß es sich bei dem aus der Eschenrinde isolierten Hemmstoff IV wahrscheinlich um einen phenolischen Naturstoff handelt (vgl. Kap. 8 c), wandten wir ein für phenolische Inhaltsstoffe geeignetes Isolierungsverfahren an.

Hierbei konnten wir die Ausbeute an Hemmstoff IV von 0,0023 % auf 0,005 % steigern.

Das zur Isolierung verarbeitete Rindenmaterial von *F. excelsior* stammte aus dem Forstbotanischen Garten in Grafrath. Es wurde im Monat Juni ge-



Abb. 11. Sekundäre Hemmzonenbildung von Hemmstoff IV ($1,5\times$).

sammelt und ganz frisch, wie unter B/1 beschrieben, zur Extraktion vorbereitet.

Zwei kg Rinde wurden zunächst 48 Std. (Extrakt A), dann weitere 72 Std. (Extrakt B) mit je 5 l reinem Äther ausgezogen. Aus beiden Auszügen schieden sich beim Stehenlassen reichlich weiße Niederschläge aus. Im Agar-diffusionstest auf *B. subtilis*-Platten zeigten lediglich die Filtrate biologische Aktivität. Filtrat A ergab bei einer Konzentration von 20 mg/ml Hemmhöfe zwischen 20–26 mm, Filtrat B dagegen bei gleicher Konzentration nur Hemmzonen von etwa 10–12 mm. Die Filtrate wurden einzeln im Vakuum bei 12 mm Hg-Druck und 30° C vom Äther befreit. Nach Aufnahme in Äther trat ein weiterer Niederschlag auf, der ebenfalls nicht wirksam war und daher verworfen wurde. Durch Petrolätherfällung der eingeeengten ätherischen Lösungen erhielten wir aktive Substanzen, die in je 50 ml Äther aufgenommen und dreimal mit je 50 ml 2 n-NaOH ausgeschüttelt wurden. Die vereinigten alkalischen Phasen säuerten wir mit 2 n-HCl auf ca. $p_H = 3$ an und extrahierten sie 16mal mit je 25 ml reinem Äther. Die vereinigten Ätherlösungen fraktionierten wir nach Einengen auf etwa 30 ml auf einer 31 cm langen und 3 cm breiten Säule von neutralem Aluminiumoxyd nach BROCKMANN, Aktivitätsstufe I, die wir zuvor wie üblich vorbereitet hatten.

Wir eluierten zunächst mit 1500 ml peroxyd- und wasserfreiem Äther und fingen 15 Fraktionen zu je 100 ml auf. Der Äther wurde im Vakuum bei 30° C abgedampft, wobei lediglich die Fraktionen 8–12 insgesamt 4–5 mg stark riechende, flüchtige, öltartige Substanz von deutlicher biologischer Wirksamkeit enthielten. Im biologischen Test zeigte sie die 4 bis 5fache Wirksamkeit gegenüber dem ätherischen Rohextrakt. Die Identifizierung dieser bisher nicht beschriebenen Substanz ist noch offen.

Nach Abschluß der Ätherelution fraktionierten wir mit Methanol p.a.–Äther p.a. (1 : 2,5). Wir fingen Fraktionen zu je 30 ml auf, wobei die ersten 9 Fraktionen biologische Wirksamkeit zeigten.

Papier- und Dünnschichtchromatographie (vgl. Kap. 8 c) ergaben, daß die Fraktionen 16–24 eine einheitliche Substanz enthielten. Nach Einengen im Vakuum zeigte sich, daß die Hauptmenge der Substanz in den Fraktionen 17–18 enthalten war. Die sphärolithenartigen Kristalle besaßen einen Schmelzpunkt von 92° C.

Die vereinigten Rückstände der Fraktionen 16–24 wurden bis zur Schmelzpunkt Konstanz von 93–94° C zweimal aus Chloroform umkristallisiert.

Die Substanzausbeute aus Extrakt A betrug vergleichsweise 105 mg (etwa 0,005 % der Frischrinde), während aus B nur 7–8 mg gewonnen wurden.

Die zweimal aus Chloroform umkristallisierte, von der CH-Bestimmung im Vakuum bei 2 mm Hg-Druck und 50° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz ergab bei der Analyse:

aus 4,253 mg Substanz 10,98 mg CO₂, 2,79 mg H₂O

C₈H₁₀O₂ (138,168)

Gef.: C = 70,45 %, H = 7,34 %

Ber.: C = 69,54 %, H = 7,29 %

In der CH-Bestimmung und im Schmelzpunkt stimmte die Substanz mit dem von uns auf verteilungschromatographischem Wege (s. S. 20) isolierten und als Hemmstoff IV bezeichneten Stoff überein. Auch das papier- und dünn-schichtchromatographische Verhalten war identisch (vgl. Kap. 8 c).

8. Chemische und physikalische Eigenschaften der Hemmstoffe I, III und die Identifizierung des Hemmstoffes IV

a) Hemmstoff I

Der Hemmstoff I ist in Wasser, Petroläther und Tetrachlorkohlenstoff unlöslich, in Benzol, Äther, Essigester, Aceton, Methanol und Äthanol leicht löslich. Die Hemmintensität nimmt in alkalischem Medium stark ab.

Der Stoff kristallisiert aus Benzol unter Zugabe von Petroläther (30–50° C) in büschelförmig vereinigten, farblosen Kristallen aus (Abb. 12). Er ist in geringem Maße mit organischen Lösungsmitteln flüchtig. Sein Sublimationspunkt liegt bei ca. 100° C.

Da der Stoff in sehr geringer Menge (etwa 2–3 mg) aus der Eschenrinde isoliert wurde, konnten keine näheren Daten ermittelt werden.

b) H e m m s t o f f I I I

Die Hemmintensität von Hemmstoff III ist am stärksten. Der Stoff ist in Petroläther, Tetrachlorkohlenstoff unlöslich, dagegen in einigen polaren organischen Lösungsmitteln wie Äther, Essigester, Aceton, Methanol und Äthanol leicht löslich.

Bei der Elementaranalyse¹⁾ des Stoffes konnten wegen der starken Hygroskopizität des Stoffes und wegen Bildung eines Rückstandes keine



Abb. 12. Kristalle des Hemmstoffes I (45 ×).

exakten Daten ermittelt werden. Infolge Unlöslichkeit des isolierten Stoffes in Campher war auch eine Molekulargewichtsbestimmung nicht möglich.

Auf Grund der UV- und IR-Spektren²⁾ kann folgendes diskutiert werden.

U V - S p e k t r u m : Abwesenheit eines konjugierten Chromophors.

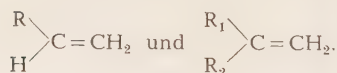
I R - S p e k t r u m : Das IR-Spektrum zeigte eine alkoholische Hydroxylgruppe bei 3335 cm^{-1} an. Ferner ist eine schwache Absorption im Bereich der N-H-Valenzschwingungen bei 3200 cm^{-1} sichtbar, die eventuell für das Vorhandensein einer NH-Gruppe spricht. Die Bande bei

¹⁾ Die Elementaranalyse und die Molekulargewichtsbestimmung wurden von A. BERNHARDT, Mikroanalytisches Laboratorium im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr, ausgeführt.

²⁾ Sämtliche IR- und UV-Spektren wurden im Max-Planck-Institut für Biochemie in München (Direktor: Prof. Dr. A. BUTENANDT) ausgeführt. Für ihre Durchführung und für Einleitung der Diskussion danke ich Herrn Prof. Dr. H. DANNENBERG und Dr. FUNCK ergebenst.

1135⁻¹ cm macht eine tertiäre OH-Gruppe möglich. Die OH-Deformations- und C-O-Valenzschwingungen bei 1070 cm⁻¹ und bei 1350 cm⁻¹ deuten auf eine oder mehrere sekundäre OH-Gruppen hin. Eine -C-O-C-Gruppierung ist gleichfalls nicht auszuschließen. Das Spektrum zeigt keine Aromatenschwingungen bei 1600 cm⁻¹ und keine Carbonyl- oder Carboxyl-Bande.

Demnach handelt es sich um ein aliphatisches oder hydroaromatisches Kohlenstoffskelett. Auf Grund der Bande bei 1430 cm⁻¹ könnte eine endständige CH₃-Gruppe vorhanden sein. Durch die langwelligen Banden bei 945 cm⁻¹ und nahe 840 cm⁻¹ wird das Vorhandensein von zwei isolierten Doppelbindungen wahrscheinlich. Auszuschließen sind die Strukturen



Die breite Bande 840 cm⁻¹ macht ein trisubstituiertes Olefin (4, S. 42) wahrscheinlich (vgl. Abb. 13).

c) Identifizierung des Hemmstoffes IV

Der Hemmstoff IV ist in Petroläther und Tetrachlorkohlenstoff unlöslich, in Chloroform erst in der Hitze, in Wasser und einigen anderen polaren organischen Lösungsmitteln wie Äther, Essigester,

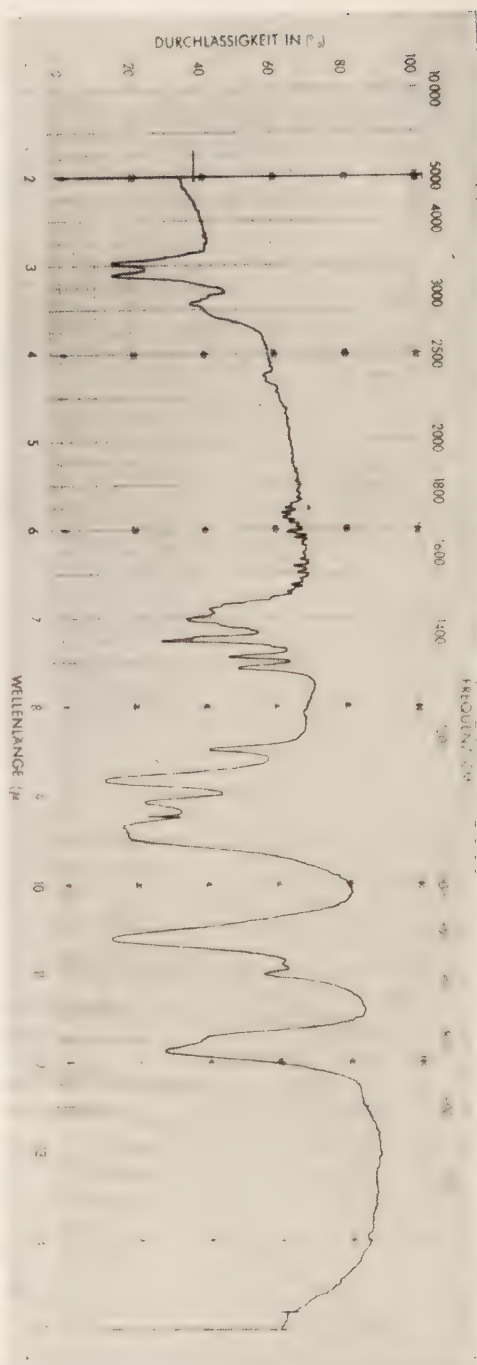


Abb. 13. IR-Spektrum des Hemmstoffes III.

Aceton, Methanol, Äthanol dagegen leicht löslich. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Chloroform zeigte die Substanz einen konstanten Schmelzpunkt von 93–94° C. Die Elementaranalyse ergab, daß die Reinsubstanz außer C, H und O keine weiteren Elemente enthielt. Aus den gefundenen CH-Werten von 69,13 % C und 7,24 % H sowie aus dem nach kryoskopischer Methode erhaltenen Molekulargewicht von 148 ließ sich die Summenformel $C_8H_{10}O_2$ berechnen.

Papier- und dünn-schicht-chromatographische Untersuchungen wiesen nach Anfärben mit Eisen-(III)-chlorid (3) oder Pauly's-Reagenz (12) auf das Vorhandensein eines phenolischen Naturstoffes hin.

Für die Anwesenheit phenolischer Gruppen sprach auch das UV-Spektrum und die Verschiebung des Spektrums im alkalischen Medium. Das Spektrum zeigte in äthanolischer Lösung zwei ausgeprägte Maxima bei $223 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 5,39$) und $278 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 5,24$) mit einer schwachen Schulter bei $285 \text{ m}\mu$. In alkalischer Lösung lieferten beide Maxima bathochrome Verschiebungen und zwar von 223 nach $240 \text{ m}\mu$ ($\Delta\lambda \text{ max.} = 17 \text{ m}\mu$) und von 278 nach $295 \text{ m}\mu$ ($\Delta\lambda \text{ max.} = 17 \text{ m}\mu$) (Abb. 14).

Das IR-Spektrum zeigt eine Reihe von ausgeprägten Banden im Bereich der OH-Valenz- und -OH-Deformationsschwingungen. Davon sind zwei Banden bei 3390 cm^{-1} und bei 3150 cm^{-1} mit Sicherheit auf vorliegende alkoholische oder phenolische OH-Gruppen (4, S. 45) zurückzuführen. Eine starke Bande bei 1237 cm^{-1} könnte auf C-O-Valenzschwingungen hindeuten. Die OH-Deformationsschwingung bei 1055 macht eine primäre alkoholische Hydroxylgruppe (30) wahrscheinlich.

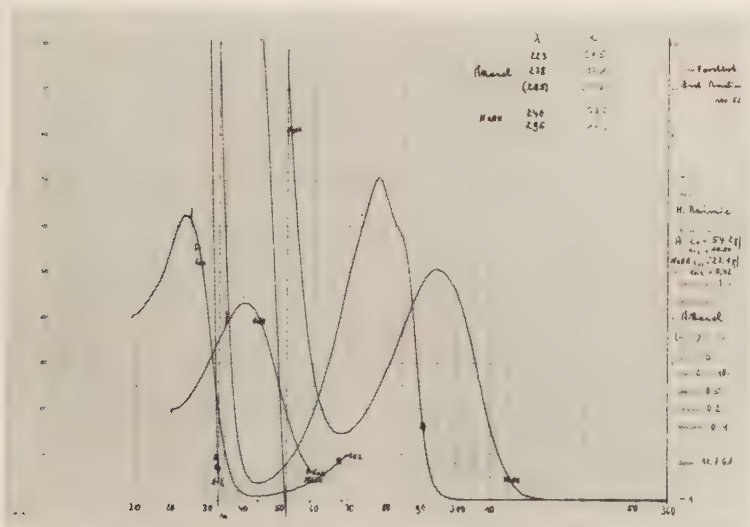


Abb. 14. UV-Spektrum des Hemmstoffes IV.

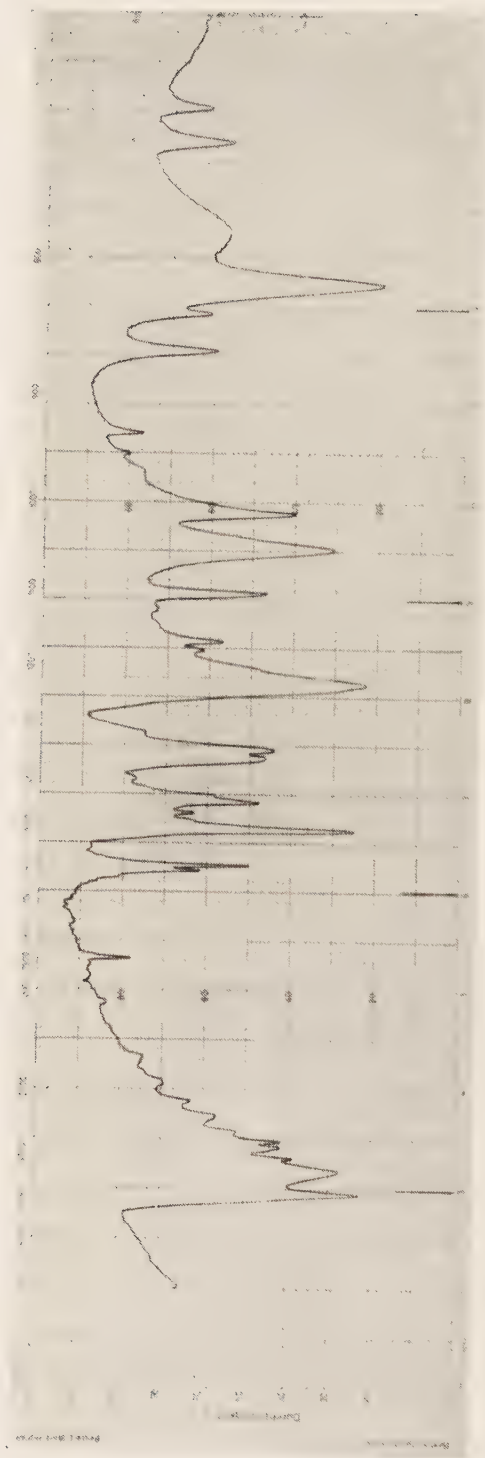
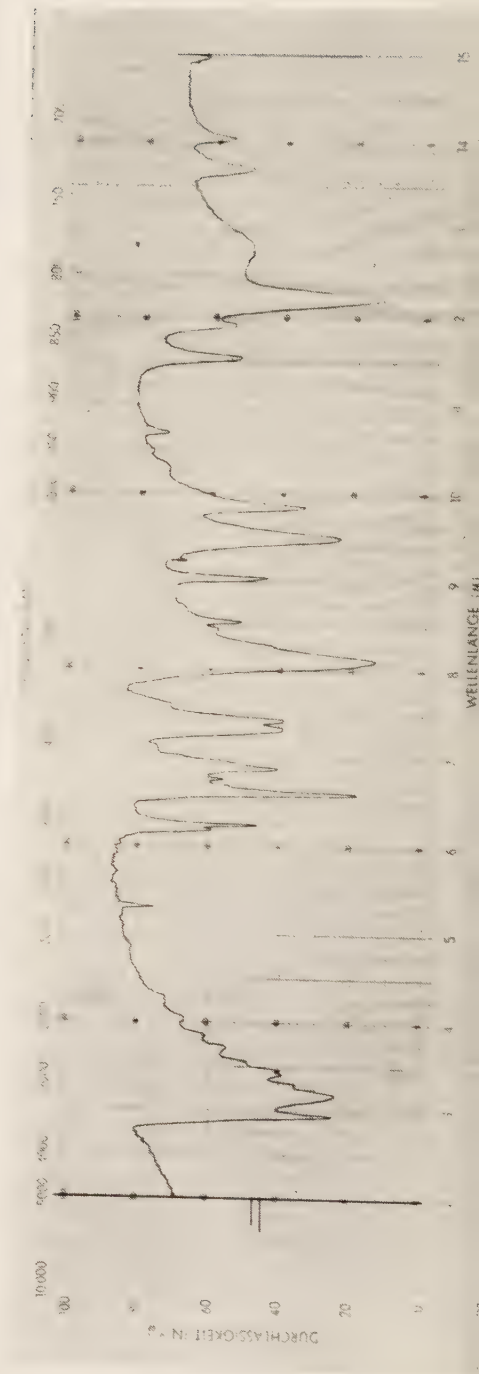
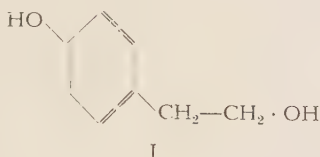


Abb. 15. IR-Spektrum des isolierten Tyrosol.

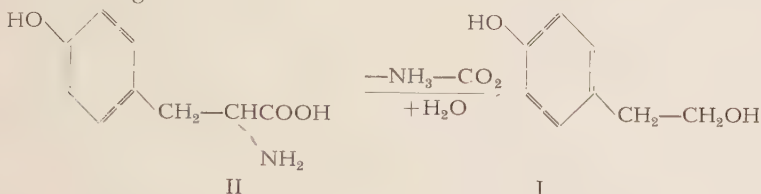


Sehr auffällig ist die Bande bei 820 cm^{-1} , die einer γ -Schwingung (out of plane deformation vibrations) zugeordnet werden kann (4, S. 51 u. 63) (Abb. 15 und 17).

CH-Werte, Molekulargewichtsbestimmung und die Ergebnisse von UV- und IR-Spektren deuten auf das Vorhandensein eines β - (p - O x y - p h e n y l) - äthylalkohols (I) hin.



Diese Verbindung, die in der Literatur unter dem Namen Tyrosol beschrieben ist und für die ein Schmelzpunkt von $92,5$ (11), $92-93$ (13) und $93,5$ (21) angegeben wird, stimmt in ihren CH-Werten (13) auch mit der von uns isolierten Substanz überein. Tyrosol wurde erstmals von EHRLICH (11) isoliert. Er konnte nachweisen, daß Tyrosol (I) bei der alkoholischen Gärung aus Tyrosin (II) durch Decarboxylierung und Desaminierung entsteht.



β -(p-Oxyphenyl)-äthylalkohol ist eine bitter schmeckende Substanz, die im Bier enthalten ist und wahrscheinlich dessen Geschmack mitbestimmt (15).

ISTTIQURO, TAKAMURA und MARUYANA (21) isolierten 1955 Tyrosol aus den Blüten von *Osmanthus fragrans*, geben jedoch außer dem Schmelzpunkt von $93,5^\circ\text{C}$ und CH-Werten keine weiteren Daten an.

FERBER (13) stellte Tyrosol synthetisch her. Die Identifizierung erfolgte jedoch lediglich auf Grund der Elementaranalyse und der Schmelzpunkte von Reinsubstanz ($92-93^\circ\text{C}$) und Benzolderivat ($F_p = 111^\circ\text{C}$).

Zur experimentellen Prüfung unserer Annahme stellten wir Tyrosol (13) zu Vergleichszwecken synthetisch her. Als Ausgangsmaterial diente β -Phenyl-äthylacetat, woraus wir das p-Nitrophenyl-derivat synthetisierten. Nach der Verseifung erhielten wir β -(p-Nitrophenyl)-äthylalkohol mit einem Schmelzpunkt von $60-61^\circ\text{C}$.

Mehrfache Versuche, β -(p-Nitrophenyl)-äthylalkohol nach FERBER mittels Zinkstaub bei Anwesenheit von Calciumchlorid zur entsprechenden Aminoverbindung zu reduzieren, führten lediglich zu einem dunkelbraunen Harz, aus dem sich die Aminoverbindung nicht isolieren ließ. Dagegen gelang die Reduktion mit Zinn-(II)-chlorid und Salzsäure. In geringer Ausbeute konnten wir die Aminoverbindung ($F_p = 107-108^\circ\text{C}$) von den Nebenprodukten abtrennen. Der Ersatz der Aminogruppe im

β -(p-Aminphenyl)-äthylalkohol durch die Hydroxylgruppe geschah über die Diazo-Verbindung nach dem üblichen Verfahren. Wir erhielten nach einmaliger Umkristallisation aus Äther und zweimaliger Umkristallisation aus Chloroform authentisches Tyrosol. Die nadelförmigen Kristalle besaßen einen Schmelzpunkt von $92,5-93^{\circ}\text{C}$.

Bei der Mischschmelzpunktbestimmung mit synthetischer und isolierter Substanz trat keine Depression auf. Auch in den CH-Werten von $69,57\%$ C und $7,24\%$ H stimmten isolier-

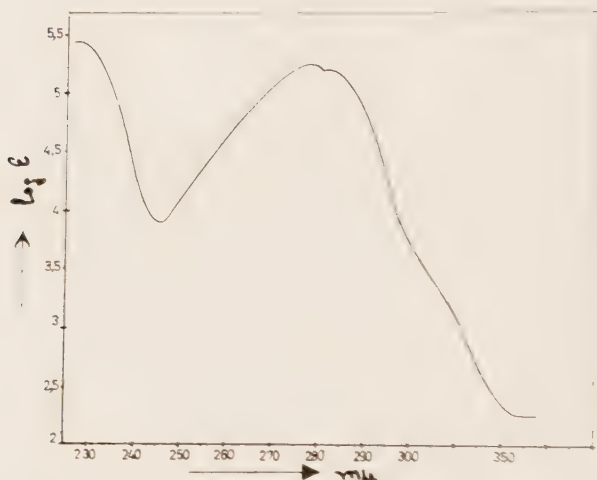


Abb. 16.
UV-Spektrum des
synthetischen
Tyrosol.
Abszisse =
Wellenlänge in $m\mu$
Ordinate = $\log \epsilon$

tes und synthetisches Produkt praktisch überein. Ihre UV- (Abb. 16) und IR-Spektren (Abb. 17) waren identisch.

Die papierchromatographischen Vergleiche beider Substanzen wurden in dem System Petroläther-Äther-Äthanol, 5 : 5 : 1, $R_F = 0,83$ und Methanol-Wasser-Aceton-Petroläther, 5 : 3 : 2 : 2 (Unterphase), R_F -Wert = 0,92 durchgeführt (vgl. Abb. 18).

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen auf gegossenen Kieselgelplatten (20) im Laufmittelsystem Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure, 5 : 4 : 1, (41) ergaben übereinstimmende R_F -Werte von 0,57. Sowohl auf den Papier- als auch auf den Dünnschichtchromatogrammen reagierten isolierter und synthetisierter phenolischer Stoff mit 2° oiger Eisen(III)chloridlösung unter Blaufärbung, die ungefähr 30 Minuten beständig ist.

Anschließend stellten wir aus dem isolierten Tyrosol mit Benzoylchlorid und Pyridin ein Benzoylderivat her. Frasse gibt für das Dibenzoylderivat einen Schmelzpunkt von 111°C an. Wir stellten fest, daß lediglich bei Verwendung eines Pyridinüberschusses am Stoff mit diesem Schmelzpunkt erhältlich ist ($F_p = 110-111^{\circ}\text{C}$). Andernfalls wurde eine Substanz vom Schmelzpunkt $53-54^{\circ}\text{C}$ erhalten, die wir nicht näher untersuchten. Die CH-Werte des Dibenzoylderivates von $75,03\%$ C und $5,27\%$ H stimmten mit berechneten praktisch überein ($76,28\%$ C, $5,23\%$ H).

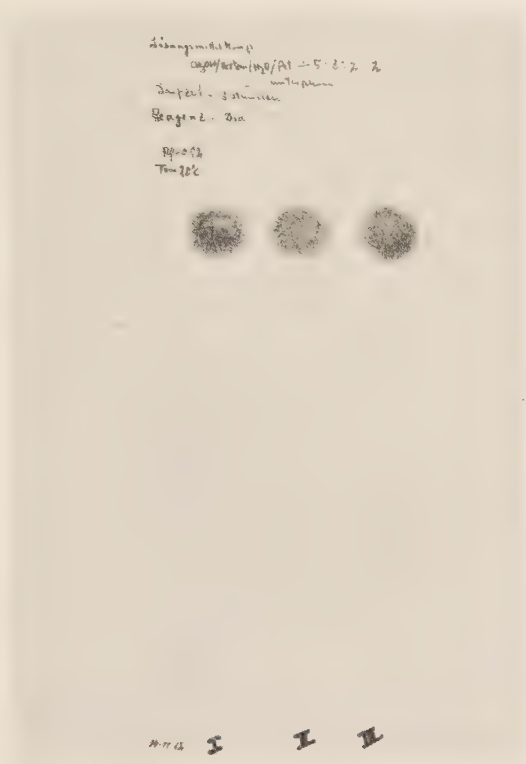


Abb. 18. Chromatographische Vergleiche der authentischen und isolierten Substanz.

- I isoliertes Tyrosol
- II authentisches Tyrosol
- III Mischchromatogramm

Auf Grund dieser Beweise sind isoliertes und synthetisiertes Produkt identisch. Es darf somit als gesichert gelten, daß es sich bei dem beschriebenen Stoff um TYROSOL handelt.

Biologisch zeigten der isolierte und der synthetisierte Stoff allerdings unterschiedliche Aktivität gegenüber *B. subtilis*. Im biologischen Test des synthetischen Stoffes wurden bei einer Konzentration von 4 mg/ml keine, bei 20 mg/ml nur Hemmhöfe zwischen 7–9 mm gemessen. Das synthetische Produkt besitzt im Verhältnis zum isolierten Stoff (vgl. S. 22) eine sehr schwache Hemmwirkung auf *B. subtilis*, wofür vorerst keine plausible Erklärung gegeben werden kann. Denkbar wäre eine geringfügige Verunreinigung der isolierten Substanz, die nicht in den physikalischen Daten, wohl aber im biologischen Test in Erscheinung tritt.

Anhang

Herstellung des Tyrosols

100 g β -Phenyl-äthylacetat ließen wir in 400 ml gekühlter Salpetersäure (etwa -12°C) eintropfen, verdünnten dann mit Eis auf das 3- bis 4fache Volumen und schüttelten mit Äther aus. Die ätherische Lösung wurde wiederholt mit Wasser ausgewaschen. Nach Abdestillieren des Äthers wurde das gebildete Nitrophenyläthylacetat im Vakuum bei 100°C entwässert.

Zur Verseifung wurde das Nitroprodukt mit 200 ml etwa 2%iger methanolischer Salzsäure 3 Stunden am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt und das Lösungsmittel mitsamt dem gebildeten Methylacetat abdestilliert. Der Rückstand wurde im Tiefkühler zur Kristallisation gebracht. Nach Absaugen und Abpressen wurde aus verdünntem Alkohol zweimal umkristallisiert. Wir erhielten β -(p-Nitrophenyl)-äthylalkohol vom Schmelzpunkt 60–61° C. Ausbeute = 69% d. Th.

Die Reduktion von β -(p-Nitrophenyl)-äthylalkohol führten wir mit Zinn(II)-chlorid und HCl durch. Zu diesem Zweck wurden 20 g Nitroverbindung mit einer äquimolaren Menge Zinnchlorid und 100 ml HCl vermischt. Das Gemisch wurde eine halbe Stunde erhitzt und nach Erkaltenlassen abfiltriert. Durch Einengen des Filtrats erhielten wir ein Kristallpulver, woraus wir mittels absoluten Alkohols den β -(p-Aminophenyl)-äthylalkohol extrahierten.

Nach Einengen der Lösung und zweimaliger Umkristallisation aus absolutem Alkohol erhielten wir die Aminoverbindung vom Schmelzpunkt 106–107° C. Ausbeute 7–10% d. Th.

Zur Herstellung von Tyrosol wurde 1 g β -(p-Aminophenyl)-äthylalkohol in 100 ml 2 n-HCl gelöst und mit einer äquimolaren Menge NaNO_2 -Lösungen bei 0° C diaziiert. Dann fügten wir einige Tropfen 0,5%iger Kupfersulfatlösung hinzu. Das Gemisch wurde eine halbe Stunde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und abgekühlt. Die saure Lösung extrahierten wir erschöpfend mit Äther. Nach Einengen der ätherischen Lösung erhielten wir ein Kristallisat, das wir aus Äther und zweimal aus Chloroform umkristallisierten. Wir erhielten Tyrosol vom Schmelzpunkt 92,5–93° C. Ausbeute 70% d. Th.

Bei der Elementaranalyse der Substanz ergaben

5,205 mg Substanzen 10,72 mg CO_2 und 2,72 mg H_2O

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$ (138,168)

Gef.: C 69,57%, H 7,24

Ber.: C 69,54%, H 7,29

Molekulargewichtsbestimmung nach Rast in Campher

0,962 mg in 9,240 mg Campher ($K = 35,9$), $\Delta t = 26,7^\circ \text{C}$

Molekulargewicht Gef.: 140

Ber.: 138,16

Herstellung des Benzoylderivats:

34 mg Substanz und 70 mg Benzoylchlorid wurden in 5 ml Pyridin gelöst und auf dem siedenden Wasserbade 3 Stunden erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt und Natriumbicarbonatlösung hinzugegeben. Die Lösung wurde 6mal mit je 10 ml Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wurde im Vakuum eingengt und das Kristallisat zweimal aus reinem Äther umkristallisiert. Wir erhielten das Dibenzoylderivat mit konstantem Schmelzpunkt von 110–111° C. Ausbeute 82% d. Th.

4,350 mg Substanz ergaben 11,96 mg CO_2 und 2,05 mg H_2O

$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (346,386)

Gef.: C 75,03%, H 5,27%

Ber.: C 76,28%, H 5,23%

9. Dünnschichtchromatographische Prüfung des Extraktes auf Tyrosol

Es wurde die Frage geprüft, ob Tyrosol ursprünglich in der Eschenrinde vorhanden oder erst während des Arbeitsganges enzymatisch oder hydrolytisch entstanden war.

Da Tyrosol lediglich mit einer Ausbeute von 0,005 % aus der Frischdroge isoliert werden konnte, andererseits die Nachweisgrenze mit Eisen-(III)-chlorid bei 60–70 γ beziehungsweise mit Paulys-Reagenz bei 10 bis 20 γ liegt, war eine Anreicherung des fraglichen Tyrosols im Rohextrakt erforderlich.

Tabelle 13

Flecken Nr.	R _F -Wert	UV- Fluoreszenz	Tageslicht besprüht mit Paulys-Reagenz
1	0,85	—	gelb
2	0,77	—	gelb
3	0,71	hellgelb	gelb
4	0,63	blau	hellgelb
5	0,57	graublau	violettrot
6	0,45	blau	hellrot
7	0,32	dunkelbraun	gelbbraun
8	0,09	—	gelb
9	0,05	dunkelbraun	braun

Zu diesem Zweck fällten wir nach Ätherextraktion die aktiven Substanzen mit Petroläther aus. Der Niederschlag wurde in Äther aufgenommen und dünnschichtchromatographisch mit dem System Chloroform-Äthylacetat-Ameisensäure (5 : 4 : 1) (41) untersucht. Unter dem UV-Licht sowie nach Besprühen mit Paulys-Reagenz ergab sich das in Abb. 19 und Tab. 13 dargestellte Bild.

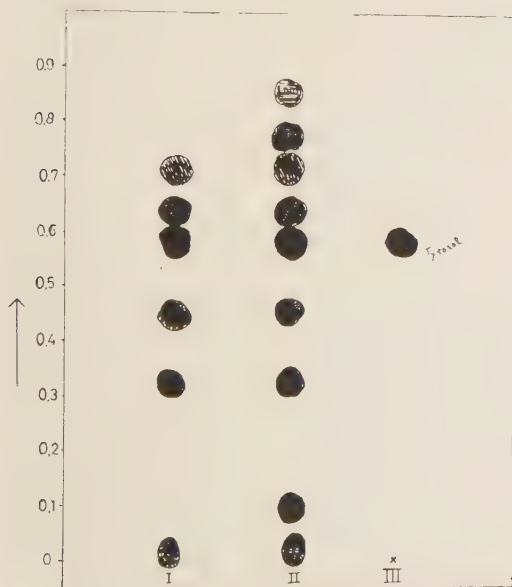


Abb. 19. Schema eines Dünnschichtchromatogramms zur Prüfung auf Tyrosol.

- I. Unbesprühte Lösung im UV-Licht
- II. Lösung im Tageslicht nach Besprühen mit Paulys-Reagenz
- III. Reinsubstanz im Tageslicht nach Besprühen mit Paulys-Reagenz

Das Chromatogramm zeigte in Höhe der Testsubstanz Tyrosol einen Fleck mit graublauer UV-Fluoreszenz. Da Tyrosol selbst nicht fluoresziert, mußte es sich um eine andere Substanz handeln.

Zur weiteren Anreicherung des fraglichen Tyrosols fertigten wir mehrere Streifenchromatogramme an und eluierten die unter dem UV-Licht markierte Zone mit Äther. In der dünnschichtchromatographischen Untersuchung fehlte der fluoreszierende Fleck. Er mußte im Gegensatz zum Rohextrakt nach chromatographischer Trennung ätherunlöslich geworden sein. Nach dem Besprühen mit Paulys-Reagenz trat lediglich ein Fleck mit dem R_F -Wert 0,57 auf, der die gleiche Laufhöhe wie die Testsubstanz besaß.

Hiermit war der chromatographische Beweis erbracht, daß Tyrosol in der Eschenrinde ursprünglich vorhanden war.

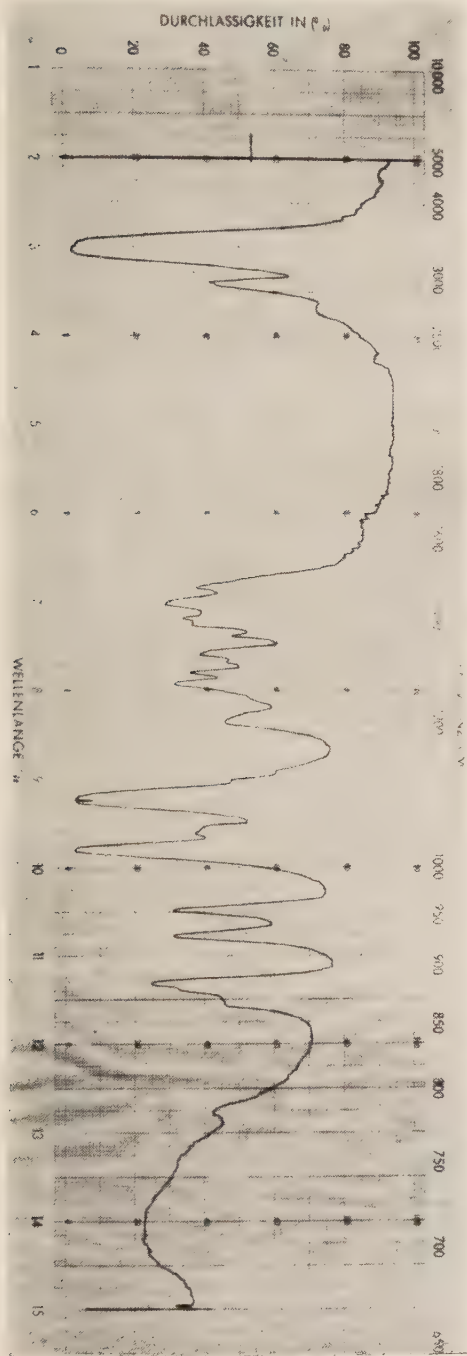
10. Identifizierung eines nicht aktiven, kristallinen Stoffes aus der Eschenrinde

Der Aufgabenstellung entsprechend haben sich unsere bisherigen Analysen ausschließlich mit der Isolierung der gegen *B. subtilis* wirksamen Stoffe beschäftigt, während inaktive Fraktionen unberücksichtigt blieben. Ein Stoff fiel jedoch beim Einengen des Rohextraktes in so auffälligen Mengen an (Ausbeute: 0,37–0,5 % der Frischrinde), daß wir uns, obwohl es nicht zum eigentlichen Thema gehörte, um eine nähere Kennzeichnung bemühten.

Die Substanz kristallisierte aus einer wäßrigen Lösung bei Zugabe von Äthanol in feinen, nadelförmigen, weißen Kristallen (Abb. 20) aus. Sie war im Wasser löslich, in organischen Lösungsmitteln dagegen unlöslich.



Abb. 20. Kristalle der nicht aktiven Substanz (45 $\times$ vergrößert).



Nach zweimaliger Umkristallisation aus wäßrigem Alkohol und anschließend aus Wasser zeigte die Substanz einen konstanten Schmelzpunkt von $168-170^{\circ}\text{C}$. Aus der Analyse ließ sich eine Bruttzusammensetzung von $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ berechnen mit einem Molekulargewicht von 332

Im UV-Spektrum zeigte die Substanz kein Maximum. Das IR-Spektrum (Abb. 21) zeigte mehrere OH-Deformations- und OH-Valenzschwingungen, aber keine C-C-Doppelbildung an.

Nach den obigen Angaben könnte es sich um einen Zucker oder eine zuckerähnliche Substanz handeln. Diese Vermutung konnte durch weitere Versuche bestätigt werden. Nach Säurehydrolyse (mit 5 %iger H_2SO_4) konnten durch quantitative Zuckerbestimmung nach HAGEDORN-JENSEN (18) und parallel dazu durch papierchromatographische Untersuchung mit Anilinphthalat (33) oder Benzidin (31, S. 66) zwei reduzierende Substanzen nachgewiesen werden. Die eine hiervon wurde als Glukose identifiziert. Die andere bislang nicht identifizierte Substanz besitzt zwar den gleichen R_F -Wert wie die Rhamnose, zeigte aber bei der chromatographischen Anfärbung unterschiedliches Verhalten.

Abb. 21. IR-Spektrum des nicht aktiven Stoffes.

Biologisch ist die Substanz insofern interessant, als sie nur während der Vegetationsruhe isoliert werden konnte. Sie kommt wahrscheinlich als Reservestoff in der Eschenrinde vor und kann in der Vegetationszeit nicht isoliert werden.

Isolierung

400 g frische, im Dezember gesammelte Rinde wurden, wie unter B/1 beschrieben, zur Extraktion vorbereitet und fünf Tage mit 2 l 96 %igem Alkohol unter gelegentlichem Schütteln bei Zimmertemperatur mazeriert. Den zur Trockne eingeeengten Extrakt (38 g) nahmen wir in 50 ml Wasser auf und schüttelten mit je 50 ml Äther bis zur Farblosigkeit der Ätherphase aus. Aus der wäßrigen Lösung schieden sich nach Einengen im Vakuum Kristalle aus, die zweimal aus wäßrigem Alkohol und anschließend aus Wasser umkristallisiert wurden. Wir erhielten mit 0,5 %iger Ausbeute Kristalle vom konstanten Schmelzpunkt 168–170° C.

CH-Bestimmungen¹⁾

Vor der Analyse wurde die Substanz bei 105° C getrocknet. 4,397 mg Substanz ergaben 6,33 mg CO₂ und 2,91 mg H₂O.

C₁₁H₂₄O₁₁ (332, 313)

Gef.: C = 39,29 %, H = 7,41 %

Ber.: C = 39,78 %, H = 7,27 %

Vor CH-Bestimmung wurde die Einwaage im Vakuum bei 50° C und 2 mm Hg-Druck quantitativ bis Gewichtskonstanz getrocknet.

4,465 mg Substanz ergaben 6,51 mg CO₂, 3,13 mg H₂O

C₁₁H₂₄O₁₁ (332, 313)

Gef.: C = 39,79 %, H = 7,84 %

Ber.: C = 39,78 %, H = 7,27 %

Molekulargewichtsbestimmung nach Rastin Campher

0,780 mg Substanz in 7,927 mg Campher (K = 38,0)
 $\Delta t = 1,1^\circ \text{C}$

Mol. Gewicht berechnet = 332,313
 gefunden = 340

Identifizierungsversuche

Wir führten nach der Hydrolyse die Bestimmung der Monosaccharide nach der Methode von HAGEDORN-JENSEN, modifiziert nach SCHUSTER (40), durch. 50 mg Substanz wurden mit 50 ml 5 %iger Schwefelsäure auf dem siedenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt (bis zu 8 Stunden), wobei nach gewissen Zeitabständen 10 ml-Proben entnommen wurden. Sodann wurde jede Probe mit 750 mg Bariumoxyd neutralisiert und filtriert.

¹⁾Die Elementaranalysen und die Molekulargewichtsbestimmungen wurden von A. BERNHARDT, Mikroanalytisches Laboratorium im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr, ausgeführt.

Zur Zuckertitration nach HAGEDORN-JENSEN wurden 0,1–0,2 ml der Zuckerlösung mit H_2O auf 6 ml verdünnt, mit 2 ml der Lösung 1 versetzt, 15 min. im siedenden Wasserbade gekocht, abgekühlt und 2 ml der Lösung 2 zugefügt. Dieses Gemisch wurde mit 2 ml der Lösung 3 angesäuert und das ausgeschiedene Jod mit Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert.

Erforderliche Lösungen

Lösung 1: Wäßrige Lösung von 1,65 g Kaliumferricyanid p.a. und 10,6 g wasserfreies Natriumcarbonat auf 1000 ml

Lösung 2: Kaliumjodid-Zinksulfatlösung

a) 5 g KJ in 50 ml H_2O

b) 10 g Zinksulfat pur. eisenfrei und 50 g Natriumchlorid in 150 ml H_2O

Die Lösungen a) und b) wurden vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 3 gemischt

Lösung 3: 3 %ige Essigsäure p.a. eisenfrei

Als Indikator wurde eine 1 %ige Stärkelösung, die mit Kochsalz gesättigt war, zur Titration n/200 Natriumthiosulfatlösung (0,7 g in 500 ml H_2O) verwendet. Die Titerstellung erfolgte mit Kaliumjodat; von reinstem wasserfreiem Kaliumjodatsalz wurden 0,3566 auf 2 l gelöst.

Tabelle 14

% Gehalt reduzierende Substanz in Abhängigkeit von der Hydrolysezeit.

Hydrolyse- dauer in Stunden	% reduzierende Substanz		
	1. Bestim- mung	2. Bestim- mung	3. Bestim- mung
1	49,5	47	50
2	69,5	70,5	69
4	97,5	97,5	95
6	45	44	44,5
8	29	27,5	30,5

Vor der Hydrolyse konnte keine reduzierende Substanz durch diese Methode nachgewiesen werden.

Zur papierchromatographischen Untersuchung gelangten 10 ml Hydrolysat, die nach 4 Std. Hydrolysedauer entnommen und mit Bariumoxyd neutralisiert wurden. Nach Filtration chromatographierten wir auf Papier Schleicher & Schüll 2043 b mit dem System n-Butanol-Wasser-Eisessig, (4 : 5 : 1) (31). Die Sichtbarmachung erfolgte durch Aufsprühen von Anilinphthalatlösung oder Benzidin und anschließendes Erhitzen auf 120°C , wobei 2 Flecken mit den R_F -Werten von 0,18 (I) und 0,37 (II) sichtbar wurden.

I ergab mit Benzidin dunkelbraune, mit Anilinphthalat olivbraune Farbreaktion und gelbe UV-Fluoreszenz. II färbte sich mit Benzidin

gelbbraun, mit Anilinphthalat rosa. Mit Vanillin trat keine Reaktion auf. Nach PATRIDGE (33) ergeben Aldopentosen mit Anilinphthalat rotbraune Flecken mit roter Fluoreszenz, andere Zucker wie Aldoheptosen olivbraune Flecken mit gelber Fluoreszenz. Bei I könnte es sich gemäß PATRIDGE um eine Aldoheptose handeln. Der hohe R_F -Wert von II macht das Vorhandensein einer Pentose oder eines Desoxy-Zuckers wahrscheinlich.

Im R_F -Wert kommt I der Glukose (R_F -Wert = 0,18), II der Rhamnose (R_F -Wert = 0,37) sehr nahe. Auch im System (Collidin-Wasser) (31, S. 66) stimmten die R_F -Werte der beiden reduzierenden Substanzen mit denen von authentischer Glukose und Rhamnose überein.

Auf Grund der R_F -Werte und Farbreaktionen konnte somit I chromatographisch als Glukose identifiziert werden. Die unterschiedlichen Farbreaktionen von Substanz II und Rhamnosetestsubstanz trotz gleicher R_F -Werte lassen eine andere Substanz vermuten. Ihre Identifizierung ist noch offen.

D. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über Rohextraktgewinnung, Nachweis, Isolierung und Identifizierung von vier Hemmstoffen aus der Eschenrinde und über ihre chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften berichtet.

1. Die Hemmaktivität des Rohextraktes ist innerhalb einer Stunde bei 50° C stabil, darüber nimmt die Hemmaktivität stark ab. Bei 103° C ist keine Hemmwirkung mehr nachweisbar. Bei Alterung des Rohextraktes in Zimmertemperatur nimmt die biologische Aktivität ab.

Bei -10° C wird die Hemmwirkung des Rohextraktes mehrere Monate konstant erhalten.

Für die vorgereinigte Rohextraktgewinnung werden zwei Verfahren ausgearbeitet. Bei direkter Ätherextraktion wurde eine Ausbeute von 0,18–0,25 % und bei Alkoholextraktion eine Ausbeute von 0,308 bis 0,535 % aus der Eschenrinde erhalten.

2. Es wird über zwei Verfahren zur Gewinnung der aktiven Stoffe aus Eschenrinde berichtet, wobei bei dem 1. Verfahren eine Ausbeute von 0,015–0,027 % und bei dem 2. Verfahren eine Ausbeute von 0,059 bis 0,066 % bezogen auf Frischrinde erhalten wird.
3. Aus der verteilungschromatographischen Aufarbeitung der aktiven Stoffe an Kieselgur werden Hemmstoffe aus der Benzol-, Chloroform-, Äther- und Essigesterfraktion gewonnen (I–IV).

Zur Isolierung der vier verschiedenen Rindenhemmstoffe wird je eine Methode beschrieben. Die Hemmstoffe aus der Benzol-, Äther- und Essigesterfraktion wurden in reinem und kristallisiertem Zustand isoliert. Der Hemmstoff aus der Chloroform-Fraktion konnte weitgehend gereinigt werden.

4. Der Hemmstoff IV konnte als Tyrosol identifiziert werden. Es wurde über eine neue Isolierungsmethode für Tyrosol berichtet, wobei die Ausbeute an Tyrosol von 0,0023 % auf 0,005 % (bezogen auf Frischrinde) gesteigert werden konnte. Weiterhin wurde eine Methode zur Herstellung synthetischen Tyrosols und des Dibenzoylderivats ausgearbeitet.
5. Vom Hemmstoff III aus der Ätherfraktion wurden die IR- und UV-Spektren angegeben.
6. Es wurde über die Isolierung und Reindarstellung eines in Kristallform isolierten nicht aktiven Stoffes, der nur während der Vegetationsruhe gewonnen wird, berichtet. Der Stoff wurde als Zucker, bestehend aus Glukose und einer nicht identifizierten Pentose oder Desoxypentose erkannt. Seine Bruttozusammensetzung errechnet sich aus der Analyse $C_{11}H_{24}O_{11}$, sein Molekulargewicht beträgt 332, und sein Schmelzpunkt liegt bei 168–170° C.

Nachwort

Für die Überlassung des Themas danke ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. h. c. B. HUBER, für kritische Beratung den Herren Professoren Dr. F. LYNEN und Dr. L. HORHAMMER. Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. L. HORHAMMER für die Überlassung eines Lehrplatzes in seinem Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre. Herrn Regierungsrat Dr. J. JUNG bin ich für die tatkräftige Unterstützung und Betreuung der Arbeit dankbar. Für wissenschaftliche Beratung danke ich besonders den Herren Privatdozent Dr. H. WAGNER und Dr. H.-W. KONIG vom Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre. Auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die einen Teil der Instrumente für die chromatographischen Arbeiten zur Verfügung stellte, sei gebührend gedankt. Für die Photoarbeiten danke ich Fräulein A. JOHN und Herrn Oberpräparator J. HEY, ebenso Fräulein V. SIEBENLIST für die Zeichenarbeiten.

Literatur

1. Atkinson, N., Austral. J. exp. Biol. **34**, 1956. 12.
2. —, and H. C. Brice, Nature (London) **182**, 1958. 547.
3. Bate-Smithe, E. C., and R. G. Westall, Biochim., Biophys. Acta **4**, 1950. 427.
4. Belamy, L. J., Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution. Darmstadt 1955.
5. Biginelli, P., Gazz. Chim. Ital. **25**, II, 1895. 365.
6. —, e G. Koerner, Gazz. Chim. Ital. **21**, II, 1895. 452.
7. Büchner, J. A., und J. E. Herberger, Buchn. Repert. **48**, 1834. 249.
8. Butin, H., und V. Loeschcke, Naturwissenschaften **47**, 1960. 451.
9. Chain, E., H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing and A. G. Sanders, Lancet **240**, 1940. 226.
10. De Bary, A., Die Erscheinung der Symbiose. Straßburg 1879.
11. Ehrlich, F., Ber. dtsch. chem. Ges. **40**, 1907. 1047.

12. Evans, R. A., W. H. Parr und W. C. Evans, *Nature* (London) **164**, 1949. 674.
13. Ferber, E., *Ber. dtsh. chem. Ges.* **62**, 1929. 190.
14. Ferency, L., und L. Gracza, *Naturwissenschaften* **44**, 1957. 590.
15. Fieser, L. F., und M. Fieser, *Lehrbuch der organischen Chemie*. Weinheim 1954.
16. Fleming, A., *Brit. J. exp. Pathol.* **10**, 1924. 226.
17. Gäumann, E., *Pflanzliche Infektionslehre*. 2. Aufl. Basel 1951.
18. Hagedorn-Jensen, *Biochem. Z.* **135**, 1922. 46 u. **137**, 1922. 92. Vgl. P. Rona, *Praktikum der physiologischen Chemie*. 1. Teil.
19. Heatley, N. G., *Biochem. J.* **38**, 1944. 61.
20. Hörhammer, L., H. Wagner und G. Bittner, *Dtsch. Apotheker* **14**, 1962. 48.
21. Isttiquro, N. K., K. Takamura and T. Maruyana, *Ref.: Chem. Abstr.* **46**, 1955. 16358.
22. Jung, J., *Phytopath. Ztschr.* **27**, 1956. 405.
23. —, *Naturwissenschaften* **46**, 1959. 657.
24. —, *Naturwissenschaften* **48**, 1961. 134.
25. —, und M. Plempe, *Phytopath. Ztschr.* **38**, 1960. 245.
26. —, und C. Stoll, *Phytopath. Ztschr.* **31**, 1957. 180.
27. Keller, J. P., *Buchn. Repert.* **44**, 1833. 438.
28. Kienholz, M., und B. Kemkes, *Centralbl. Bakt. I* **167**, 1957. 610.
29. Klöpping and G. J. M. van der Kerk, *Nature* (London) **167**, 1951. 996.
30. Lecomte, *Traité de Chimie Organique*. **2**, Paris 1936. 143.
31. Linskens, H. F., *Papierchromatographie in der Botanik*. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955. 57 u. 66.
32. Pasteur, L., *Oeuvres de Pasteur*. Paris 1922.
33. Patridge, S. M., *Nature* (London) **164**, 1949. 443.
34. Rochleder, F., und R. Schwarz, *Ann.* **87**, 1853. 186.
35. Osborn, E. M., *Brit. J. exp. Pathol.* **24**, 1943. 227.
36. Salm-Horstmar, *Pogg. Ann.* (2) **100**, 1857 u. **107**, 1859. 327.
37. Schuster, E., *Dissert.* München 1951.
38. Schwab, G. E., *Dissert.* Zürich 1941.
39. Späth, E., und Z. Jerzmonowska-Sienkiewiczowa, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **70**, 1937. 698.
40. —, und —, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **70**, 1937. 1019.
41. Stahl, E., und P. J. Schorn, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **325**, 1961. 263.
42. Stenhouse, J., *Phil. Jag. Sci.* (4) **7**, 1854. 501 und A **91**, 1854. 255.
43. Stuart, H. A., U. Veirl und M. Hartmann-Fahnenbrook, *Naturwissenschaften* **40**, 1953. 3395.
44. Tokin, *Phytonzide*. Berlin 1956.
45. Virtanen, A. I., *Giorn. Microbiol.* **2**, 1956. 15 u. 42.
46. —, *Acta chem. Scand.* **11**, 1957. 1432.
47. —, *Schweiz. Ztschr. allg. Pathol.* **21**, 1958. 970.
48. —, *Acta chem. Scand.* **14**, 1960. 499.

49. —, Acta chem. Scand. **14**, 1960. 502.
50. Vogel, H., Die Antibiotica. Nürnberg 1951.
51. Wagner, H., Pharmaz. Ztg. **105**, 1960, 1533.
52. Waksman, S. A., and A. Schatz, J. Amer. Pharm. Assoc. **34**, 1945. 273.
53. Wessely, F., und E. Demmer, Ber. dtsch. chem. Ges. **61**, 1928. 1274 u. **62**, 1929. 120.
54. Winter, A. G., Heilkunst **69**, 1950—1957.
55. —, Therapie **I**, 1954. 126.
56. —, und Willeke, Naturwissenschaften **38**, 1951, 457.
57. —, —, Naturwissenschaften **40**, 1953. 247.

Lebenslauf

Am 2. 3. 1934 wurde ich, Hussein NAIMIE, als drittes Kind meines Vaters Abi Akbar NAIMIE und seiner Ehefrau Sakina geb. ASLAMIE in Kabul/Afghanistan geboren. 1940 trat ich in die Nejdatoberrealschule in Kabul ein, wo ich 1953 mit dem Abitur abschloß. Anschließend studierte ich ein Jahr Chemie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Kabul.

Seit 1955 studiere ich an der Universität München Naturwissenschaften. Während meines Studiums habe ich mich besonders mit biologischer Chemie beschäftigt. Am Forstbotanischen Institut München hatte ich Gelegenheit, in dieser Arbeitsrichtung eine wissenschaftliche Arbeit auszuführen.

